

**Immunologische und chemische Untersuchungen
an L-Laktat-Dehydrogenasen
verschiedener Milchsäurebakterien**

Reinhard Hensel

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0092

Immunologische und chemische Untersuchungen

an L-Laktat-Dehydrogenasen

verschiedener Milchsäurebakterien

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Reinhard Hensel

aus

Nördlingen

September 1977



1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der Einreichung der Arbeit: 21. 9.1977

Tag der Annahme der Arbeit: 7.11.1977

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.1977

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung.....	1
Material und Methoden.....	7
1. Reagenzien.....	7
2. Organismen.....	8
3. Anzucht der Organismen.....	9
4. Messung des Wachstums.....	9
5. Pufferzusammensetzung.....	9
6. Enzymtest.....	10
7. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	10
7.1 Platten-Gel-Elektrophorese in exponentiellen Polyacrylamid-SDS-Gelen.....	10
7.2 Platten-Gel-Elektrophorese in Polyacrylamid- Harnstoff-Gelen.....	11
8. Proteinbestimmung.....	11
9. Präparation der Oxamat-Sepharose.....	12
10. Enzymreinigung.....	12
10.1 Reinigung der L-LDH-asen von L.acidophilus und L.plantarum.....	12
10.1.1 Präparation des zellfreien Extraktes.....	12
10.1.2 Hitzefällung.....	13
10.1.3 Affinitätschromatographie I (Oxamat-Sepharose).....	13
10.1.4 Affinitätschromatographie II (AMP-Sepharose)...	13
10.2 Reinigung der L-LDH-asen von L.casei und L.cur- vatus.....	14
11. Perameisensäureoxydation.....	14
12. Bedingungen für die HCl-Hydrolyse.....	14
13. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung.....	15
14. Bestimmung des isoelektrischen Punktes.....	15
15. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure.....	15
16. Bestimmung der C-terminalen Aminosäure.....	16
16.1 Carboxypeptidase A - Spaltung.....	17
16.2 Carboxypeptidase C - Spaltung.....	17
17. Bromcyanspaltung	18

	Seite
18.	Auftrennung der Bromcyanfragmente..... 18
18.1	Trennung über Harnstoff-Polyacrylamid-Platten-Gel-Elektrophorese..... 18
18.2	Trennung über SDS-Polyacrylamid-Platten-Gel-Elektrophorese..... 19
19.	Tryptischer Abbau des Proteins..... 19
20.	Kartierung der tryptischen Peptide..... 19
21.	Aminosäurebestimmung der tryptischen Peptide... 20
22.	Reaktion der SH-Gruppen mit para-Hydroxymercuribenzoat und Jodacetamid..... 20
23.	Immunologische Methoden..... 20
23.1	Präparation der zellfreien Extrakte für den Standard-Immudiffusionstest..... 20
23.2	Präparation der Antiseren..... 21
23.3	Durchführung der Immudiffusionstests..... 21
23.3.1	Standard-Immudiffusionstest..... 21
23.3.2	Modifizierter Immudiffusionstest..... 22
Teil I	Immunologische Studien an allosterisch regulierbaren und nicht regulierbaren L-Laktatdehydrogenasen verschiedener Milchsäurebakterien. 24
1.	Einleitung..... 24
2.	Ergebnisse..... 27
2.1	Charakterisierung der antigenen Eigenschaften der L-LDH-asen von L.curvatus und L.casei im Immudiffusionstest..... 27
2.1.1	Prüfung auf Veränderung der antigenen Eigenschaften der Enzymproteine während der Reinigung..... 27
2.1.2	Vergleich der Immunreaktionen von tetrameren und renaturierungsfähigen monomeren L-LDH-Formen..... 29
2.1.2.1	Verhalten gegenüber anti-L.casei L-LDH..... 30
2.1.2.1.1	Testbedingungen, die den monomeren Zustand begünstigen..... 30
2.1.2.1.2	Testbedingungen, die den tetrameren Zustand begünstigen..... 31
2.1.2.1.3	Testbedingungen, unter denen Tetramere und Monomere nebeneinander vorliegen können..... 32
2.1.2.1.4	Interpretation der Immunreaktionen..... 36

2.1.2.2	Verhalten gegenüber anti-L.curvatus L-LDH.....	39
2.1.2.2.1	Testbedingungen, die den monomeren Zustand begünstigen.....	39
2.1.2.2.2	Testbedingungen, die den tetrameren Zustand begünstigen.....	39
2.1.2.2.3	Testbedingungen, unter denen Tetramere und Monomere nebeneinander vorliegen können.....	40
2.1.2.2.4	Interpretation der Immunreaktionen.....	41
2.1.3	Wirkungsspezifität der Mn^{2+} -Ionen.....	44
2.1.4	Vergleich der Immunreaktionen von tetrameren und nicht mehr renaturisierungsfähigen monomeren L-LDH-Formen.....	45
2.1.4.1	Verhalten gegenüber anti-L.casei L-LDH.....	45
2.1.4.2	Verhalten gegenüber anti-L.curvatus L-LDH.....	46
2.1.4.3	Interpretation der Immunreaktionen.....	46
2.2	Immunologische Kreuzreaktionen der L-LDH-asen innerhalb der Familie der Milchsäurebakterien..	50
2.2.1	Immunreaktionen mit anti-L.casei L-LDH.....	50
2.2.2	Immunreaktionen mit anti-L.curvatus L-LDH.....	55
2.2.3	Immunreaktionen mit anti-L.plantarum L-LDH.....	56
3.	Diskussion.....	60
3.1	Quartärstruktur und immunologisches Verhalten der L-LDH von L.curvatus und L.casei.....	60
3.1.1	Vergleich der Ergebnisse aus immunologischen Untersuchungen, Sedimentationsanalysen und Hybridisierungsversuchen.....	60
3.1.2	Interpretation der unterschiedlichen Antigenität von monomeren und tetrameren L-LDH.....	62
3.2	Immunologischer Vergleich der L-LDH-asen verschiedener Milchsäurebakterien.....	65
3.2.1	Berücksichtigung von Dissoziationseffekten der Antigene.....	65
3.2.2	Immunologische Beziehung zwischen regulierbaren und nicht regulierbaren L-LDH-asen.....	66
3.2.3	Die Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den L-LDH-asen der Milchsäurebakterien als Ausdruck phylogenetischer Beziehungen.....	67

Teil II	Chemische Charakterisierung der allosterisch regulierbaren L-LDH-asen von L.casei und L.curvatus und der nicht regulierbaren L-LDH-asen von L.plantarum und L.acidophilus.....	71
1.	Einleitung.....	71
2.	Ergebnisse.....	75
2.1	Reinigung der L-LDH-asen von L.plantarum und L.acidophilus.....	75
2.2	Molekulargewicht der Untereinheiten der L-LDH-asen der 4 Milchsäurebakterien.....	77
2.3	Bestimmung des isoelektrischen Punktes.....	78
2.4	Aminosäurezusammensetzung.....	79
2.5	Reaktion mit Jodacetamid und para-Hydroxymercuribenzoat zur Blockierung von SH-Gruppen.....	81
2.6	N- und C-terminale Aminosäure.....	83
2.7	Kartierung der Bromcyanpeptide.....	84
2.8	Kartierung der tryptischen Peptide.....	84
2.8.1	Chemische Charakterisierung verschiedener tryptischer Peptide.....	87
2.8.1.1	Aminosäurezusammensetzung des Arg ₆ -Peptids.....	89
2.8.1.2	Aminosäurezusammensetzung des Lys ₂ -Peptids.....	89
3.	Diskussion.....	92
	Zusammenfassung.....	102
	Literaturverzeichnis.....	106

Verwendete Abkürzungen

AMP	Adenosin 5'-Monophosphat
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
atm	Atmosphären
B.	Bifidobacterium
BrCN	Bromcyan
D-LDH (Mz. D-LDH-asen)	D (-)-Laktat-Dehydrogenase (NAD-Oxidoreduktase, E.C. 1.1.1.28)
DNase	Desoxyribonuclease I E.C. 3.1.4.5
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
E.	Escherichia
Fru-1,6-P ₂	Fruktose-1,6-Diphosphat
GC = G + C	Guanin + Cytosin
h	Stunden
L.	Lactobacillus
Lc.	Leuconostoc
L-LDH (Mz. L-LDH-asen)	L (+)-Laktat-Dehydrogenase (NAD-Oxidoreduktase, E.C. 1.1.1.27)
L-LDH H ₄	Isoenzym I (Herzmuskel)
L-LDH M ₄	Isoenzym V (Skelettmuskel)
M	molar
M.	Micrococcus
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
N	normal
NAD	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidierte Form
NADH	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduzierte Form
NCDO	National Collection of Dairy Organismus, Shinefield, Reading, England
P.	Pediococcus

p-HMB	para-Hydroxymercuribenzoat
Rogosa	M. Rogosa, National Institute of Dental Research, Bethesda, Maryland, USA
Sc.	Streptococcus
SDS	Na-Dodecylsulfat
ssp.	Subspecies
TPCK	L (1-Tosylamido-2-phenyl)äthylchloro-methyl-Keton
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (internationale Enzymeinheit) = 1 μ Mol/min

Aminosäuren:

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Glx	Glutamin oder Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

Einleitung

Ziel der Systematik ist die Aufstellung eines natürlichen Systems, das die Phylogenie nachzeichnet. Ein Ordnungsprinzip, das möglichst viele Merkmale möglichst detailliert berücksichtigt, wird dabei am ehesten geeignet sein, die genealogischen Beziehungen aufzudecken.

Die Systematik der Bakterien ist hauptsächlich auf die Auswertung physiologischer und molekularbiologischer Merkmale angewiesen; denn im Gegensatz zu allen anderen Mikroorganismen zeichnen sich die Bakterien durch eine besondere morphologische Einheitlichkeit aus, so daß morphologische Gesichtspunkte bei der Einteilung der Bakterien nur eine untergeordnete Rolle spielen (De Ley und Kersters, 1975).

Auch dem unmittelbaren Vergleich des Genotyps, von dem direkte Aufschlüsse über entsprechende verwandtschaftliche Beziehungen erwartet werden können, sind enge Grenzen gesetzt. So erlauben DNS-DNS-Hybridisierungsstudien nur innerhalb sehr geringer phylogenetischer Abstände quantitative Aussagen; denn die - infolge der geringen Generationszeit - hohe Mutationsfixierung bei den Bakterien bewirkt bereits innerhalb kurzer phylogenetischer Abstände eine derart drastische Veränderung des Bakterienchromosoms, daß keine meßbare DNS-DNS-Hybridisierung mehr erfolgt.

Demgegenüber vermag ein Vergleich physiologischer Eigenschaften als Ausdruck wichtiger Biosynthese- bzw. Energiestoffwechselwege größere Organismengruppen zu charakterisieren. So erfolgte beispielsweise die heute noch gültige Einteilung der Laktobazillen in die 3 Gruppen der Streptobakterien, Thermobakterien und Beta-bakterien aufgrund physiologischer Eigenschaften, speziell aufgrund des homo- bzw. heterofermentativen Glucoseabbaus (Orla Jensen, 1919).

Eine Einteilung mit Hilfe der ebenfalls klassischen Methode der Zuckervergärungsspektren ist demgegenüber wegen der hohen Variabilität dieses Merkmals wieder nur innerhalb kleinerer phylogenetischer Abstände sinnvoll.

Insgesamt können physiologische Eigenschaften als Einteilungskriterien für ein natürliches System nur dann herangezogen werden, wenn auch tatsächlich feststeht, daß es sich hier um Merkmale homologer Stoffwechselwege handelt.

Eine endgültige Entscheidung darüber kann letztlich nur die Molekularbiologie geben. So ist die Mikrobiologie bei der Rekonstruktion der bakteriellen Evolution auf biochemische und biophysikalische Methoden angewiesen, die homologe Struktureinheiten von Makromolekülen wie RNS, DNS, Enzymproteinen und Murein erfassen können. Dabei vermag ein Vergleich der entsprechenden homologen makromolekularen Strukturen selbst schon qualitativ oder auch quantitativ Hinweise auf die stattgefundene Entwicklung geben.

Die makromolekulare Evolution kann um so sicherer stellvertretend für den jeweiligen Organismus angesehen werden, je mehr einzelne Genprodukte für die Analyse zur Verfügung stehen. Für diesen Homologievergleich erweisen sich die Enzyme des Primärstoffwechsels als Untersuchungsobjekt besonders geeignet, da sie sich einerseits als Katalysatoren des Grundstoffwechsels relativ konservativ verhalten - Homologien somit leicht erkennbar sind - und da sie andererseits in einem weiten Kreis von Organismen anzutreffen sind. Zudem bieten sie für experimentelle Untersuchungen den Vorteil, daß sie in relativ hohen Mengen von der Zelle produziert werden.

Insbesondere isofunktionelle Enzyme, die sich in experimentell leicht bestimmbar Größen, wie Bruttoladung und Enzymkatalyse, bereits in einem sehr engen Verwandtschaftskreis recht deutlich voneinander unterscheiden, boten sich schon relativ früh als Einteilungs- und Ordnungskriterien an.

Die Zymogramm-Methode erwies sich dabei aufgrund der schnellen

und reproduzierbaren Durchführbarkeit als sehr geeignet, Enzyme zu klassifizieren. So wurde beispielsweise die elektrophoretische Beweglichkeit der Esterasen, Katalasen, Peroxidasen, D-LDH-asen und L-LDH-asen als Unterscheidungsmerkmal zwischen Bakterienstämmen bei Mycobakterien, Bazillen und Milchsäurebakterien herangezogen (Norris, 1962; Norris und Burges, 1963; Cann und Willox, 1965; Cann et al., 1966; Robinson, 1966; Gasser, 1970; Kandler und Stetter, 1973). Da diese Methoden relativ pauschale Eigenschaften (im Fall der Zymogramm-Methode: Ladung in Verbindung mit Molekülgröße) charakterisieren, kommt ihnen allerdings nur eine beschränkte Bedeutung als Differenzierungsmittel zu. Phylogenetische Systeme lassen sich mit ihnen nicht aufbauen, da man kaum annehmen kann, daß sich der Unterschied in der elektrophoretischen Beweglichkeit direkt proportional zu der Änderung in der Aminosäuresequenz der entsprechenden Enzyme verhält (cf. De Ley und Kersters, 1975).

Demgegenüber eignen sich serologische Vergleiche isofunktioneller Proteine eher, phylogentische Beziehungen aufzudecken. Die Serologie stellt eine spezifische Methode dar, Änderungen an der Proteinoberfläche qualitativ und quantitativ zu erfassen. Da die Änderung der Oberflächenstruktur eine direkte Funktion der Veränderung der Primärstruktur darstellt, kann der mit dieser Methode bestimmbare Ähnlichkeitsgrad in Bezug auf ein homologes Antigen auch als phylogentischer Abstand zwischen diesen Antigenen interpretiert werden.

Homologien können jedoch über die Serologie nur dann noch erkannt werden, wenn weniger als 30 - 40 % der Aminosäuren in der Primärstruktur ausgetauscht wurden (Prager und Wilson, 1971).

Über weitreichende Verwandtschaftsbeziehungen geben nur noch mehr oder weniger ausgeprägte Sequenzhomologien Auskunft, wie sie mit Hilfe von Primär- und Tertiärstrukturuntersuchungen festgestellt werden. Hier kann der berechnete durchschnittliche minimale Basenaustausch pro Codon über die gesamte Sequenz oder über die als homolog identifizierte Teil-Sequenz als angenähertes Maß für den Grad der phylogentischen Beziehung gelten.

Die einzelnen Sequenzbereiche eines Proteins weisen dabei selbst wieder unterschiedliche Evolutionsraten auf: Immunologisch erfaßbare Teile der Oberflächenstruktur verändern sich im Laufe der Evolution schneller als zentrale Bereiche wie Substrat- oder Cosubstratbindungsstellen.

Je nach Untersuchungsmethode werden somit entweder die große Entwicklungslinie oder die einzelnen Differenzierungen während der Evolution im Detail sichtbar.

Die L-LDH weist alle Eigenschaften eines guten systematischen Merkmals auf. Als Enzym des Primärstoffwechsels gibt sie einmal aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung als Untersuchungsobjekt die Möglichkeit, einen sehr großen Organismenkreis zu erfassen. Zum anderen weist der gleiche Aufbau aus 4 Untereinheiten mit je einem Molekulargewicht von ungefähr 35 000 aller bisher untersuchten L-LDH-asen auf ein sehr konservatives und damit homologes Bauprinzip hin. Und zum Dritten schließlich deckt schon ein grober Vergleich der enzymatischen wie elektrophoretischen Eigenschaften eine auffallend große Vielfalt der bakteriellen L-LDH-asen auf, deren strukturelle Erfassung mit geeigneten Methoden ein differenziertes Bild der Evolution dieses Enzyms erwarten läßt, das - übertragen auf den ganzen Organismus - einen wertvollen Beitrag zur Erstellung eines phylogenetisch begründeten Systems leisten kann, das bei guter Trennschärfe einen weiten Organismenkreis zu umfassen vermag.

Unter den bakteriellen L-LDH-asen können nicht regulierbare von allosterisch regulierbaren Enzymen unterschieden werden, wobei die allosterisch regulierbaren L-LDH-asen weiter unterteilt werden müssen in Enzyme, die nur durch Fru-1,6-P₂ aktiviert werden, wie sie bei Streptokokken, Staphylokokken, Bifidobakterien, Mycoplasmen und Actinomyceten gefunden werden

(De Vries et al., 1967; Wolin, 1964; Wittenberger und Angelo, 1970; Jonas et al., 1972; Brown und Wittenberger, 1972; Mou et al., 1972; Neimark und Lemcke, 1972; Neimark und Tung, 1973; Schleifer und Kocur, 1973; Götz und Schleifer, 1975; Brown et al., 1975), und in Enzyme, die zur optimalen Aktivität

zusätzlich zu Fru-1,6-P₂ zweiwertige Metallionen wie Mn²⁺ benötigen (De Vries et al., 1970; Holland und Pritchard, 1975). Die letztere Enzymspecies ist dabei auf wenige Arten der Milchsäurebakterien beschränkt; wie Arbeiten von Stetter (1973) bzw. von Kandler und Stetter (1973) zeigen, findet sich diese Regulierbarkeit der L-LDH durch Mn²⁺ und Fru-1,6-P₂ nur innerhalb der Untergattung *Streptobacterium* der Gattung *Lactobacillus*.

Die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDH-asen neben der der D-LDH-asen speziell innerhalb der Laktobazillen veranlaßte Gasser (1970), diese physikalische Eigenschaft einem Ordnungssystem innerhalb dieser für die Lebensmittelindustrie so wichtigen Mikroorganismen zugrunde zu legen. Wie Gasser zeigen konnte, lassen sich aufgrund der elektrophoretischen Beweglichkeit der LDH-asen - hier wurden allerdings nur nicht regulierbare L-LDH-asen in den Vergleich einbezogen - Organismengruppen abgrenzen, deren Mitglieder auch im GC-Gehalt ihrer DNS gut übereinstimmen, während Organismen, deren LDH-asen eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit aufweisen, auch im GC-Gehalt ihrer DNS keine Übereinstimmung zeigen. Diese Einteilung aufgrund der elektrophoretischen Beweglichkeit der LDH-asen stellt somit mehr als nur eine formale Einteilung dar.

Eine Erweiterung und Differenzierung dieses Ordnungssystems erlaubten die Arbeiten von Kandler und Stetter (1973), die bei ihren vergleichenden Untersuchungen auch die elektrophoretische Beweglichkeit der durch Fru-1,6-P₂ und Mn²⁺ regulierbaren L-LDH-asen neben anderen biochemischen Merkmalen, wie elektrophoretische Beweglichkeit der D-LDH-asen, Besitz einer Laktatracemase, GC-Gehalt der DNS und Mureinstruktur einbezogen.

Nähere Aufschlüsse über die phylogentischen Zusammenhänge innerhalb der Milchsäurebakterien brachten serologische Studien von Gasser und Gasser (1971) mit Antiseren gegen L- und D-LDH-asen verschiedener Vertreter der Thermo- und Betabakterien. Besonders ausgeprägte immunologische Ähnlichkeiten lassen sich innerhalb derjenigen Organismengruppen erkennen, die auch sehr

gut in dem GC-Gehalt ihrer DNS übereinstimmen. Außerdem zeigt ein Vergleich der antigenen Eigenschaften der L- und D-LDH-Asen jener Laktobazillen, die beide LDH-Asen besitzen, daß sich die gleichen Ähnlichkeitsabstufungen ergeben, unabhängig davon, ob gegen anti-D-LDH oder gegen anti-L-LDH getestet wurde. Die gefundenen Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den LDH-Oberflächenstrukturen der hier hauptsächlich untersuchten Thermobakterien, Betabakterien- und Leuconostoc-Stämme lassen sich somit durchaus als Ausdruck der evolutionären Entwicklung nicht nur eines Proteins, sondern des gesamten Organismus verstehen.

Bei diesen Arbeiten wurden aber die allosterisch regulierbaren L-LDH-Asen der Streptobakterien nicht näher in den immunologischen Vergleich einbezogen.

In der vorliegenden Arbeit (Teil I) wird deshalb unter besonderer Berücksichtigung der allosterisch regulierbaren Enzyme der Streptobakterien die immunologischen Ähnlichkeitsbeziehungen sowohl zwischen den L-LDH-Asen der Streptobakterien als auch zwischen den letzteren und denen der übrigen Milchsäurebakterien untersucht.

Im Teil II dieser Arbeit soll geklärt werden, ob zwischen den regulierbaren und nicht regulierbaren L-LDH-Asen der Laktobazillen Unterschiede in der Primärstruktur festgestellt werden können, die für das unterschiedliche enzymatische Verhalten dieser L-LDH-Asen verantwortlich gemacht werden können.

Darüber hinaus soll durch einen Vergleich besonders konservativer Teile der Primärstruktur tierischer L-LDH-Asen mit denen der regulierbaren und nicht regulierbaren L-LDH-Asen verschiedener Milchsäurebakterien geprüft werden, ob sich tierische und bakterielle L-LDH-Asen von einem LDH-Gen ableiten.

Material und Methoden

1. Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien mit Ausnahme von Agarose (reinst), Acrylamid (reinst), N,N'-Methylenbisacrylamid (reinst), Amidoschwarz (reinst), Coomassie Brilliant Blau (rein) und Na-Dodecylsulfat (reinst) waren vom Reinheitsgrad p.A. . Acrylamid wurde vor dem Gebrauch 1mal in Aceton umkristallisiert.

Herkunft der Reagenzien:

Fru-1,6-P₂; L-LDH (Kaninchen, Iso I); Boehringer, Mannheim
NAD; NADH; Pyruvat

Komplettes Freund'sches Adjuvant	Difco, Detroit (USA)
Fluorescamin	Hoffmann La Roche, Basel (Schweiz)
Sepharose 4 B; 5'-AMP-Sepharose	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Cellulose-Acetat-Elektrophorese- folien; Polyamid-Plättchen	Schleicher und Schüll, Kassel
Agarose; Amidoschwarz; Acrylamid; N,N'-Methylenbisacrylamid; Coomassie Brilliant Blau; Dansyl- chlorid; DEAE Cellulose (23 SH); DNase; Na-Dodecylsulfat; N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin; 2,4,6 Trinitrobenzolsulphonsäure	Serva, Heidelberg
Lithium-Laktat; Jodacetamid; para-Hydroxymercuribenzoat	Sigma, München

Alle übrigen Chemikalien und Enzyme stammten von Merck, Darmstadt.

2. Organismen

Übersicht über die verwendeten Mikroorganismen:

Gattung	Untergattung	Species	Herkunft	Bezeichnung
Lacto- bacillus	Strepto- bacterium	L.casei ssp.alactosus	ATCC	27216
		L.casei ssp.casei	ATCC	334
		L.casei ssp.casei	ATCC	393
		L.casei ssp.casei	ATCC	27092
		L.casei ssp.pseudo- plantarum	DSM	20008
		L.casei ssp.rhamnosus	ATCC	7469
		L.casei ssp.tolerans	DSM	20012
		L.coryniformis ssp. coryniformis	DSM	20001
		L.curvatus	DSM	20010
		L.plantarum ssp. plantarum	ATCC	14917
		L.sake	ATCC	15578
		L.xylosus	ATCC	15577
		L.zeae	ATCC	15820
	Thermo- bacterium	L.acidophilus	DSM	20243
		L.helveticus	DSM	20075
		L.lactis	ATCC	12315
		L.salivarius ssp. salivarius	Rogosa	HO 128 X
	Beta- bacterium	L.cellobiosus	ATCC	11739
		L.confusus	NCDO	1975
		L.reuteri	DSM	20016
		L.viridescens	DSM	20248
		L.viridescens ssp. halotolerans	DSM	20190
		L.viridescens ssp.minor	DSM	20014
Strepto- coccus		Sc.faecalis	DSM	20376
		Sc.faecium	DSM	20382
		Sc.milleri	DSM	20061
Pedio- coccus		P.cerevisiae	DSM	20291
Leuco- nostoc		Lc.mesenteroides	DSM	20071
Bifido- bacterium		B.adolescentis	ATCC	15703
		B.pseudolongum	ATCC	25526
Micro- coccus		M.luteus	ATCC	4698

3. Anzucht der Organismen

Alle Organismen mit Ausnahme der Micrococcus-, Streptococcus- und Bifidobakterienstämme wurden in MRS-Medium (De Man et al., 1960) angezogen. Die Anzucht der Micrococcus- und Streptococcusstämme erfolgte in Hefe-Dextrose-Medium. Dieses Medium enthält pro Liter 10 g Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g Glucose und 5 g NaCl; der pH wird mit NaOH auf 7,4 - 7,6 eingestellt. Die Bifidobakterienstämme wurden im sog. Clostridien-Anreicherungs-Medium (CAM-Medium), modifiziert nach Lauer und Kandler (1976), kultiviert.

L.casei ssp. *casei* ATCC 393 und *L.curvatus* DSM 20010 wurden in Fermenter-Kulturen (Mayr, 1977), alle anderen Stämme in Stand-Kulturen ohne Belüftung gezogen. Die Kulturen der Thermobakterien, Streptokokken und Bifidobakterien wurden bei 37°C, alle anderen Stämme bei 34°C bebrütet.

Zu Beginn der stationären Phase wurden die Kulturen mit Eis abgekühlt und durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden 2mal mit Leitungswasser gewaschen und bei -17°C gelagert.

4. Messung des Wachstums

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt. Für die entsprechenden Messungen wurde die jeweilige Bakteriensuspension soweit mit Nährmedium verdünnt, daß Extinktionswerte unter 0,5 abgelesen werden konnten.

5. Pufferzusammensetzung

Zur Herstellung der verwendeten Acetat-, Imidazol- und Tris-puffer wurde Acetat, Imidazol bzw. Tris in entsprechender Konzentration vorgelegt. Der pH-Wert des Acetatpuffers wurde mit konzentrierter Essigsäure, der von Imidazol- bzw. Tris-puffer mit konzentrierter Salzsäure eingestellt. Der pH-Wert (pH 7,1) des für die immunologischen Experimente benötigten Phosphatpuffers wurde durch Mischen äquimolarer Lösungen von K_2HPO_4 und KH_2PO_4 eingestellt (Rauen, 1964).

6. Enzymtest

Der Standard-Test-Ansatz für die L-LDH von *L.casei* und *L.curvatus* enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml 17 mM Pyruvat, 0,65 mM NADH, 3 mM Fru-1,6-P₂ (Trinatriumsalz), 10 mM MnSO₄ und 80 mM Acetat-Puffer pH 4,8.

0,1 bis 0,2 µg Enzymprotein in einem Volumen von 20 µl wurden in die Testlösung eingesetzt.

Derselbe Testansatz, jedoch ohne MnSO₄ und Fru-1,6-P₂ fand bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität der gereinigten L-LDH von *L.plantarum* und *L.acidophilus* Anwendung.

Für die Routinebestimmung der Enzymaktivität während der Reinigung der L-LDH-Asen von *L.plantarum* und *L.acidophilus* wurde wegen der in rohen Präparationen vorhandenen D-LDH-Aktivität die Oxydation von L-Laktat anstelle der Pyruvat-Reduktion gemessen. Der Standard-Test (1 ml Gesamtvolumen) enthielt hierfür 0,4 M Glycin-Puffer pH 9,0, 1,7 % Hydrazin-Hydrat, 3,9 mM NAD und 0,2 M L-Laktat.

Die Umsatzrate von NAD bzw. NADH wurde bei 366 nm in einem Eppendorf-Photometer mit angeschlossenem Kompensations-schreiber gemessen.

7. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

7.1 Platten-Gel-Elektrophorese in exponentiellen Polyacrylamid-SDS-Gele

Die Polyacrylamid-SDS-Gele wurden in Plattenform (12 cm x 11 cm x 0,15 cm) in einer von der Fa. Hölzl (Dorfen) hergestellten Apparatur gegossen. Ein exponentieller Acrylamid-Gradient von 5 - 25 % Acrylamid wurde nach Mirault und Scherrer (1971) hergestellt. Die Mischung der Gradienten für die 20 ml-Gele erfolgte in einer fest verschließbaren 12 ml fassenden Mischkammer. Die Gelplatten wurden mit Obergel gegossen. Die Probenkammern (Volumen: 25 bis 30 µl) wurden durch Einpolymerisieren einer entsprechenden Schablone ("Kamm") im Obergel ausgespart.

Die Probenvorbehandlung, die Herstellung des Kammerpuffers und des Obergels erfolgten nach Laemmli (1970).

Jeweils 0,5 - 5 µg Protein wurden aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung (12 Stunden/150 Volt) wurden die Proteinbanden nach der Methode von Weber und Osborn (1969) mit Coomassie Brillant Blau angefärbt.

7.2 Platten-Gel-Elektrophorese in Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen

Die Harnstoffgelplatten hatten die gleichen Abmessungen wie die entsprechenden SDS-Gel-Platten. Probenauftragspuffer, Kammerpuffer und die Zusammensetzung der Harnstoff-Polyacrylamid-Gele (8 M Harnstoff, 5 % Acrylamid, pH 8,7) entsprachen den Angaben von Jovin et al. (1964). Die Gelplatten wurden ohne Obergel gegossen; das Volumen der einpolymerisierten Probenkammern betrug auch hier 25 - 30 µl.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 180 Volt. Die Anfärbung der Proteinbanden wurde wieder mit Coomassie Brillant Blau vorgenommen.

8. Proteinbestimmung

In allen Fällen wurde der Proteingehalt nach der Mikro-Methode von Heil und Zillig (1969) bestimmt. Diese Methode erwies sich in einem Bereich von 1 - 10 µg Protein als sehr genau. Die entsprechenden Proteinlösungen (1 - 5 µl) wurden mittels Kapillarpipetten auf Cellulose-Acetat-Elektrophoresefolien aufgetragen.

Bei verdünnten Proteinlösungen wurde mehrmals auf die gleiche Stelle pipettiert. Vor jedem wiederholten Auftragen, ebenso wie vor dem Anfärben mit Amidoschwarz muß die Auftragstelle mit dem Fön gründlich getrocknet werden. Nach 10minütigem Färben in 0,25 % Amidoschwarz (gelöst in einem Methanol-Wasser-Eisessig-Gemisch (v:v:v = 45:45:10)), gründlichem Entfärben im entsprechenden Methanol-Wasser-Eisessig-Gemisch ohne Färbereagens und Trocknen der Folie wurden die aufgetragenen Proben ausgestanzt, in 0,5 ml eines Gemisches aus 80 ml Ameisensäure, 10 ml Eisessig und 1 g Trichloressigsäure aufgelöst und die

Extinktion bei 623 nm im Eppendorf-Photometer gemessen. Der Null-Punkt des Gerätes wurde mit einer entsprechend behandelten Probe ohne Protein eingestellt.

Als Referenz wurde bei jedem Test die Extinktion einer Probe mit bekanntem Proteingehalt (4 µl einer BSA-Lösung der Konzentration von 1 mg/ml bestimmt.

9. Präparation der Oxamat-Sepharose

Sepharose 4 B wurde durch BrCN aktiviert und anschließend mit Hexamethyldiamin nach der Methode von Cuatrecasas (1970) substituiert. Die freie Aminogruppe des gebundenen Diamins wurde über eine Amidbindung an Oxalat nach der Vorschrift von O'Carra und Barry (1972) in Modifikation der Methode nach Spielmann et al. (1973) gekoppelt.

Nach 24 Stunden wurde die Koppelungsreaktion abgebrochen. Das Gel wurde gründlich mit Wasser gewaschen und unter Zusatz von 0,1 % NaN_3 bei 4°C gelagert.

Um den vollständigen Ablauf der Koppelungsreaktion zu prüfen, wurde im Anschluß an die Reaktion mit Trinitrobenzolsulphonsäure (Cuatrecasas, 1970) auf die Anwesenheit noch freier Aminogruppen getestet.

10. Enzymreinigung

10.1 Reinigung der L-LDH-asen von L.acidophilus und L.plantarum

10.1.1 Präparation des zellfreien Extraktes

100 g Zellen (Naßgewicht) wurden in 50 ml 0,1 M Acetat-Puffer pH 5,5 suspendiert. Nach der Zugabe von ca 1 mg DNase wurden die Zellen in der French-Press (Aminco) bei 1400 atm aufgeschlossen. Der Preßvorgang wurde mindestens 3mal wiederholt. Die Zellsuspension und die Druckzelle wurden vor jedem Aufschlußvorgang mit Eis auf 0 bis 4°C gekühlt. Nach dem Aufschluß wurden die größeren Zellbruchstücke vom löslichen Protein durch 40 min Zentrifugation bei 48 000 g abgetrennt.

10.1.2 Hitzefällung

Im ersten Reinigungsschritt wurden die Rohextrakte von *L. plantarum* und *L. acidophilus* 5 min auf 50°C (*L. plantarum*) bzw. auf 70°C (*L. acidophilus*) in einem Schüttel-Wasserbad erhitzt und anschließend rasch in einem vorbereiteten Eisbad abgekühlt. Das präzipitierte Protein wurde durch Zentrifugation entfernt (30 min bei 48 000 g).

10.1.3 Affinitätschromatographie I (Oxamat-Sepharose)

Die Affinitätssäule (3,2 cm x 15 cm) wurde mit 0,01 M Acetat-Puffer pH 5,5, der zusätzlich 1 mM NADH und 0,215 M NaCl (*L. plantarum*) bzw. 0,1 M NaCl (*L. acidophilus*) enthielt, vorgespült. Anschließend wurde der durch die Hitzefällung gereinigte Extrakt auf die Säule gepumpt und mit dem 4 - 5fachen Säulenvolumen des NADH-Puffers bei einer Durchflußrate von 80 ml/h nachgespült. Pro Säule konnten etwa 200 mg Gesamtprotein aufgetragen werden. Die L-LDH-Asen wurden mit dem oben genannten Puffer, jedoch ohne NADH, eluiert und anschließend gegen 0,01 M Acetat-Puffer pH 5,5 dialysiert. Da sich die hier gereinigten L-LDH-Asen gegenüber Ammonsulfat sehr empfindlich erwiesen - nach einer Ammonsulfatfällung wurden in der Regel nur noch 65 % Aktivität wiedergefunden - wurden die L-LDH-Lösungen über DEAE Cellulose eingeeengt. Dazu wurde die L-LDH an eine minimale Menge DEAE Cellulose adsorbiert und mit einem möglichst geringen Volumen einer 1 M NaCl-Lösung in 0,1 M Acetat-Puffer pH 5,5 eluiert.

Eine zweite Chromatographie über Oxamat-Sepharose mit höherer Salzkonzentration sowohl im Auftrags- wie im Elutionspuffer (0,25 M NaCl für *L. plantarum*; 0,14 M NaCl für *L. acidophilus*) erlaubte eine zusätzliche Anreicherung.

10.1.4 Affinitätschromatographie II (AMP-Sepharose)

Als weiterer Reinigungsschritt schloß sich eine Affinitätschromatographie über AMP-Sepharose an. Auf die Effektivität und

Spezifität dieser Affinitätschromatographie bei der Reinigung tierischer L-LDH-asen wiesen bereits Mosbach et al. (1972) und Barry und O'Carra (1973) hin.

Die Bindungsaffinität der L-LDH-asen von *L.acidophilus* und *L.plantarum* zu der durch das Cosubstrat-Analoge AMP substituierten Sepharose 4 B erwies sich jedoch als relativ gering: Nur eine NaCl-Konzentration von 0,01 M konnte dem Auftragspuffer (Acetat-Puffer 0,01 M, pH 5,5) zugefügt werden, um die Bindung kontaminierender Proteine zu verhindern. Ungefähr 2 mg konzentriertes, dialysiertes Enzym konnten auf die Affinitätssäule ($\emptyset = 1,4$ cm; Bettvolumen = 20 ml) aufgetragen werden. Zur Elution der L-LDH-asen wurde dem Puffer 1 mM NADH zugegeben.

10.2 Reinigung der L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus*

Die Reinigung der L-LDH-asen dieser beiden Organismen wurde entsprechend der von Mayr (1977) beschriebenen Methode durchgeführt.

11. Perameisensäure-Oxydation

Die Perameisensäure-Oxydation wurde nach den Angaben von Hirs (1956) durchgeführt. Die Perameisensäure wurde durch 2stündiges Einwirken von 30 % H_2O_2 (0,5 ml) auf Ameisensäure (9,5 ml) bei Raumtemperatur hergestellt. Vor der Oxydation wurde das entsprechende lyophilisierte Material in 0,1 ml Ameisensäure gelöst und 30 min bei 0°C (Eisbad) inkubiert. Anschließend wurde die Oxydation durch Zugabe von 0,2 ml Perameisensäure gestartet. Nach 2,5 h Inkubation bei 0°C wurde die Reaktion durch Lyophilisation abgebrochen.

12. Bedingungen für die HCL-Hydrolyse

Die lyophilisierte Proteinprobe wurde in 5,7 N 2fach destillierter HCl bei 110°C 20 h in einem evakuierten, abgeschmolzenen Fiolax-Gläschen hydrolysiert. Die Säure wurde anschließend unter Vakuum bei 50°C entfernt. Cystein und Methionin wurden als Cysteinsäure bzw. als Methionin-Sulphon nach Perameisensäure-Oxydation bestimmt. Zur Bestimmung von Tryptophan wurde dem Hydrolysenansatz 6 % Thioglycolsäure als Oxidationsschutz (Matsubara und Sasaki, 1969)

zugegeben. Die Tryptophanausbeute von Lysozym diente bei dieser Bestimmung als Referenz.

13. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung der L-LDH-asen wurde mit einem konventionellen Unichrom Aminosäureanalysator (Beckman, München) bestimmt. Der Analysator wurde durch den Einbau eines klein-volumigen 2-Kanal-Colorimeters von LKB-Biocal modifiziert (Fujiki und Zurek, 1975). Dieser Umbau erhöhte die Empfindlichkeit des Gerätes um das 100fache. Aminosäuren in Mengen von 1 - 10 Nanomol ($\hat{=}$ 10 - 25 μ g L-LDH-Protein) konnten somit reproduzierbar bestimmt werden. Als Bezugspunkt jeder Aminosäurebestimmung diente eine Aminosäure-Standard-Mischung der Fa. Beckman.

14. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde auf Ampholine-PAG-Platten (pH-Bereich von pH 3,5 - 9,5) der Fa. LKB entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt (Karlsson et al., 1973). Der pH-Gradient wurde mit einer Oberflächen-pH-Elektrode (Metrohm Herisau Digital-pH-Meter) in Abständen von je 0,5 cm gemessen. 20 μ g der entsprechenden Enzymproteine (das entsprechende lyophilisierte Material wurde in 8 M Harnstoff gelöst) bzw. 40 μ g der Referenzproteine β -Lactoglobulin und Ovalbumin (ebenfalls in 8 M Harnstoff gelöst) wurden über Filterpapierplättchen auf die Oberfläche des Gels aufgetragen.

15. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

Die N-terminale Aminosäure der L-LDH-asen wurde mit Hilfe der Dansyl-Technik identifiziert (Hartley, 1970). Dazu wurden 0,5 - 0,75 mg lyophilisiertes Enzymprotein in 300 μ l bidest. Wasser gelöst und mit 250 mg Harnstoff versetzt. Das Endvolumen beträgt nach Zugabe von Harnstoff 500 μ l. Anschließend wurden 250 μ l Dimethylformamid, 150 μ l 0,4 M Na-Hydrogenphosphat (pH 8,9) und 100 μ l 1 % Dansylchloridlösung (in Aceton) zugegeben.

Nach etwa 1 1/2 h wurde die Reaktion - Inkubation bei 37°C im Dunkeln - mit 4 ml 10 % eisgekühlter Trichloressigsäure abgebrochen. Zur besseren Proteinfällung wurden 20 µl einer Lysozym-lösung (1 mg/ml) zugegeben. Das präzipitierte Protein wurde 2mal mit je 1 ml kaltem Aceton gewaschen, getrocknet und 14 h einer Salzsäurehydrolyse (5,7 N HCl) unterworfen. Das getrocknete Hydrolysat wurde in 20 µl eines Aceton-HCl-Gemisches (Aceton: 1 N HCl = 9 : 1) aufgenommen. Ein kleiner Tropfen dieser Lösung wurde mit der ausgezogenen Spitze einer Pasteurpipette auf ein Polyamid-Plättchen (5 cm x 5 cm) aufgetragen und mit dem Fön getrocknet. Auf der anderen Seite des Plättchens, genau gegenüber dem Auftragspunkt der Probe, wurde eine Referenzmischung aus dansylierten Aminosäuren aufgetragen und ebenfalls getrocknet.

Folgende Chromatographiesysteme fanden bei der zweidimensionalen Auftragung der dansylierten Aminosäuren Anwendung:

System I: 1,5 % Ameisensäure

System II: n-Butanol:Eisessig = 9:1 (v:v)

System III: Essigsäuremethylester:Methanol:Eisessig = 20:1:1 (v:v:v)

System IV: n-Heptan:n-Butanol:Eisessig = 3:3:1 (v:v:v)

Nach jeder Chromatographie (Dauer etwa 4 - 10 min) wurden die Plättchen gründlich getrocknet. Die Identifikation der dansylierten Aminosäuren erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm mit Hilfe einer als Referenz aufgetragenen Mischung dansylierter Aminosäuren. Bei geeigneter Beleuchtung sind die Plättchen transparent, so daß die auf der Rückseite chromatographierten Referenz-Aminosäuren auch auf der Vorderseite zu erkennen sind. Als Kontrolle wurde bei jeder Bestimmung Lysozym aus Hühnerei (N-terminale Aminosäure: Lysin) in der beschriebenen Weise parallel zur unbekannten Probe behandelt.

16. Bestimmung der C-terminalen Aminosäure

Zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäure wurden die Enzymproteine mit Carboxypeptidase A bzw. mit Carboxypeptidase C

nach der Methode von Fraenkel-Conrat (1955) bzw. von Tschesche und Kupfer (1972) inkubiert. Carboxypeptidase A spaltet bevorzugt aromatische und längerkettige Aminosäuren ab, Carboxypeptidase C setzt alle Aminosäuren einschließlich Prolin frei. Die Identifikation der Aminosäuren erfolgte mit Hilfe der Dansylierung. Als Kontrolle wurde in jedem Fall Lysozym aus Hühnerei (C-terminale Aminosäure: Leucin) und eine Probe ohne Protein zur Bestimmung des Leerwertes entsprechend den unbekannten Proben behandelt.

16.1 Carboxypeptidase A - Spaltung

Für die Spaltung mit Carboxypeptidase A (Merck) wurden 0,5 - 0,7 mg lyophilisiertes Protein in 0,2 ml eines 0,2 M N-Ethylmorpholin-Puffers pH 8,5 (der pH wurde mit Eisessig eingestellt) gelöst, durch 5 min Erhitzen auf 80°C denaturiert und schließlich auf 37°C abgekühlt. Die Proteinlösung wurde nach Zugabe von 5 - 7 µg Carboxypeptidase A ($\hat{=}$ 1 Gewichtsprozent des eingesetzten Proteins) 2 h bei 37°C inkubiert. Der pH der Lösung wurde anschließend mit 10 µl 0,1 N NaOH auf pH 9 erhöht; durch Zugabe von 20 µl einer Dansylchloridlösung (2,5 mg Dansylchlorid/ml Aceton) wurde die Dansylierung eingeleitet. Nach 1 1/2 h (Reaktion bei 37°C im Dunkeln) wurde die Dansylierung durch Zugabe von 0,8 ml eisgekühlten Acetons abgebrochen und das präzipitierte Protein durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde getrocknet und in möglichst wenig Aceton/HCl (Aceton: 1 N HCl = 19:1) für die anschließende Chromatographie auf Polyamid-Plättchen gelöst.

16.2. Carboxypeptidase C - Spaltung

Die Spaltung mit Carboxypeptidase C (Merck) wurde bei pH 5,3 (0,05 M Acetat-Puffer) durchgeführt. Das Verhältnis von zugesetzter Protease zu vorliegendem Protein betrug hier ebenfalls wie bei der Carboxypeptidase A - Spaltung 1:100. Nach 25 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Erhöhung des pH-Wertes der Lösung auf pH 9 (Zugabe von 10 µl 1 N NaOH) abgebrochen, und damit der ideale pH-Wert für die Dansylierung eingestellt. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Verfahren, wie es bei der Carboxypeptidase A - Spaltung beschrieben wurde.

17. Bromcyanspaltung (Gross und Witkop, 1962)

150 µg lyophilisiertes Enzymprotein wurden in einem fest verschließbaren Gefäß in 0,2 ml 80 % Ameisensäure gelöst und mit der gleichen Menge an BrCN versetzt. Zur besseren Handhabung wurden entsprechende Mengen einer BrCN-Lösung in 80 % Ameisensäure zugegeben. Nach 20 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Lyophilisation abgebrochen. Der eigentlichen BrCN-Spaltung schloß sich eine Perameisensäure-Oxydation (Hirs, 1956) an, um die Existenz eventueller Disulfid-Bindungen ausschließen zu können. Die Reaktionsprodukte wurden nochmals lyophilisiert und schließlich in 30 - 40 µl des Auftragspuffers für die Harnstoff-Gel-Elektrophorese (Jovin et al., 1964) gelöst.

18. Auftrennung der Bromcyanfragmente

Die Reaktionsprodukte der BrCN-Spaltung wurden zweidimensional über Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese sowohl nach Ladung (1. Dimension: Harnstoff-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) als auch Molekülgröße (2. Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) getrennt.

18.1 Trennung über Harnstoff-Polyacrylamid-Platten-Gel-Elektrophorese

Ca. 20 µl der jeweiligen Peptidlösung wurden aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der Peptide erfolgte über die Dauer von 3 1/2 h bei 180 Volt. Die die Lauffront markierende Bromphenolblau-Bande dringt unter diesen Bedingungen 7 - 8 cm in das Gel ein. Anschließend wurden - entsprechend des Probenauftragsortes und entsprechend der Lage der zugehörigen Bromphenolblau-Bande - 5 mm breite und ca 10 cm lange Gelstreifen herausgeschnitten und vorsichtig auf die Oberfläche je eines SDS-Polyacrylamid-Platten-Gels übertragen.

18.2 Trennung über SDS-Polyacrylamid-Platten-Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe von Agarose (1 % Agaroselösung in Laemmli-Auftragspuffer) wurden die Gelstreifen unmittelbar auf die Oberfläche des SDS-Polyacrylamid-Gels fixiert. Für die Trennung in der 2. Dimension fanden die von Mirault und Scherrer (1971) beschriebenen exponentiellen Gradienten-Gele (5 - 25 % Acrylamid) ohne Obergele Verwendung. Nach 5 1/2 h Elektrophorese bei einer Spannung von 150 Volt wurde der Lauf abgebrochen und die Peptide nach der Methode von Weber und Osborn (1969) angefärbt.

19. Tryptischer Abbau des Proteins

Proben von 1 - 2 mg Protein wurden durch Perameisensäure oxydiert und anschließend lyophilisiert. Die jeweilige Proteinprobe wurde in 0,3 ml 0,1 M Ammoniumbicarbonat-Lösung (pH 8,5) mit 1 % Gewichtsanteil an TPCK-Trypsin versetzt; TPCK hemmt die proteolytische Aktivität des in der Trypsinpräparation als Kontamination vorhandenen Chymotrypsins. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde nochmals die gleiche Menge an TPCK-Trypsin zugegeben. Weitere 2 h später wurde die Spaltung durch Einfrieren des Ansatzes und sofortige Lyophilisation abgebrochen.

20. Kartierung der tryptischen Peptide

Die lyophilisierten tryptischen Peptide wurden in 20 - 30 µl einer 1:3-Verdünnung des Elektrophorese-Puffers (2 M Essigsäure, 0,6 M Ameisensäure; pH 1,9) gelöst. Etwa 800 µg Protein wurden auf eine mit Elektrophorese-Puffer befeuchtete Kieselgelplatte (Merck: "DC 60"-Platte ohne Fluoreszenzindikator; 20 cm x 20 cm) aufgetragen.

Die Trennung in der 1. Dimension erfolgte durch 60 min Elektrophorese unter Anlegen von 1000 Volt/20 cm bei 5°C. Die Platte wurde anschließend gründlich getrocknet und in einem Pyridin-Eisessig-n-Butanol-Wasser-Gemisch (v:v:v:v = 40:68:14:25) 15 h senkrecht zur Richtung der Elektrophorese chromatographiert. Nach dem Trocknen der Platte wurden die Peptide mit Ninhydrin

nach Eiseley (1965) oder nach Udenfriend et al. (1972) mit Fluorescamin sichtbar gemacht. Argininhaltige Peptide wurden nach der Methode von Yamada und Itano (1965) durch die Reaktion mit Phenanthrenchinon identifiziert. Histidinhaltige Peptide wurden mit Hilfe des Pauly-Reagenz nachgewiesen (Smith, 1960). Sollten mehrere Färbereaktionen verschiedener Spezifität auf der gleichen Platte durchgeführt werden, wurde die von Eiseley (1965) angegebene Reihenfolge der Färbungen befolgt.

21. Aminosäurebestimmung der tryptischen Peptide

Unmittelbar nach der Fluoreszenzmarkierung durch Fluorescamin wurden die gewünschten Peptidflecken möglichst rasch - um ein quantitatives Weiterreagieren des Fluoreszenzfarbstoffes mit der N-terminalen Aminosäure des Peptids zu verhindern - aus der Kieselgelplatte ausgekratzt und direkt einer 20 h Hydrolyse in 5,7 N HCl bei 110°C unterworfen. Der Leerwert des Kieselgels wurde bei der quantitativen Bestimmung jeder Aminosäure berücksichtigt.

22. Reaktion der SH-Gruppen mit para-Hydroxymercuribenzoat und Jodacetamid

Die Enzyme wurden bei pH 8,3 (0,1 M Tris-Puffer) in Gegenwart und in Abwesenheit von 8 M Harnstoff 6 h mit Jodacetamid und p-HMB behandelt. Der molare Überschuß der Inhibitoren über die SH-Gruppen betrug 400:1 .

Zur Reaktivierung wurden die Enzymproben 24 h gegen 0,01 M Imidazol-Puffer pH 6,5 mit 6×10^{-3} M Mn^{2+} und 1×10^{-3} M Fru-1,6-P₂ dialysiert.

23. Immunologische Methoden

23.1 Präparation der zellfreien Extrakte für den Standard-Immundiffusionstest

1 - 3 g gewaschene Bakterienzellen wurden in 0,5 - 2 ml eines 0,01 M Acetat-Puffers (pH 5,5) resuspendiert und in 3 - 5 Durch-

gängen durch die kleine Zelle der French-Press bei 1400 atm aufgeschlossen. Anschließend wurden die Extrakte 1 h bei 100 000 g abzentrifugiert; die überstehende Proteidlösung (Rohextrakt) wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung (in 0,01 M Acetat-Puffer pH 5,5) entsprechend verdünnt und in den Test eingesetzt.

23.2 Präparation der Antiseren

Zur Immunisierung wurden ungefähr 6 Monate alte Kaninchen ("Deutsche Riesen") herangezogen. Vor der Immunisierung wurde das Serum jedes Kaninchens im Immundiffusionstest auf Fehlen einer Kreuzreaktion mit dem Antigen getestet, das injiziert werden sollte. Jedes Kaninchen erhielt innerhalb 4 Wochen 4 intradermale Injektionen und nach einer weiteren Woche eine intraperitoneale Injektion. Zur Immunisierung wurden die L-LDH-asen in nativem Zustand (Enzymlösungen in 0,01 M Acetat-Puffer pH 5,3) verwendet. Für die intradermalen Injektionen wurden entsprechende Mengen an Enzymlösung mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund'schen Adjuvant gemischt.

Insgesamt 1 mg (0,5 mg intradermal, 0,5 mg intraperitoneal) der L-LDH-asen von *L.casei ssp. casei* ATCC 393 und von *L.curvatus* DSM 20010 wurden je einem Kaninchen appliziert. Dagegen wurden 2,2 mg der *L.plantarum* L-LDH (1,2 mg intradermal, 1 mg intraperitoneal) pro Kaninchen injiziert.

Die Kaninchen wurden 3 Wochen nach der letzten Injektion ausgeblutet. Nach 12 h Lagerung bei 4°C konnte das klare Serum vom Blutkuchen abpipettiert werden (ca. 30 ml pro Kaninchen). Die Antiseren wurden bei -17°C in 1 ml Portionen gelagert.

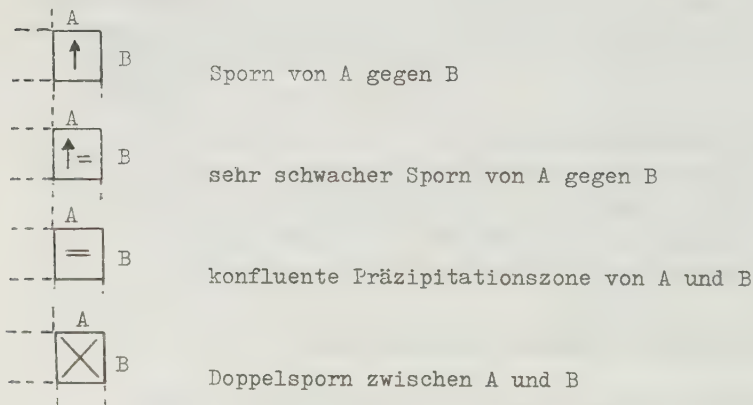
23.3 Durchführung der Immundiffusionstests

23.3.1 Standard-Immundiffusionstest (Ouchterlony, 1949)

Die Agarose-Gele wurden entsprechend den Angaben von Schwick et al. (1971) hergestellt: 100 ml Agarose-Gel enthielten 1,5 g Agarose, 40 ml 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,1 und 0,9 g NaCl. Nach dem Lösen der Agarose wurde zur Verhinderung von mikrobiellem Wachstum NaN_3

bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % zugesetzt. Je 4,5 ml dieser Mischung wurden auf einen Mikroskopier-Objektträger pipettiert. Nach Verfestigung des Gels wurden 5 äquidistante Löcher (3 mm Ø) um ein zentrales Auftragsloch im Abstand von 6 mm ausgestanzt. Die zentrale Probenkammer wurde mit 10 µl unverdünnten Serums, die seitlichen Probenkammern mit jeweils 10 µl Rohextrakt (Proteinkonzentration 3 - 5 mg/ml) bzw. 10 µl einer Lösung gereinigten Enzyms (0,1 mg/ml) gefüllt. Die Verdünnung des Rohextraktes und die der homogenen Enzym-lösung wurde so gewählt, daß das Immunpräzipitat in der Mitte zwischen seitlicher und zentraler Probenkammer erschien. Dabei erwies sich eine Enzymmenge von 3 - 4 U als ideal. Nach 16 - 20 h Inkubation in einer feuchten Kammer bei Zimmer-temperatur wurde das Ergebnis der Immuntests abgelesen und die Platten fotografiert. Nach weiteren 24 h wurde das Ergebnis nochmals überprüft. Die Diffusionstests wurden nach dem von Gasser und Gasser (1971) vorgeschlagenen System ausgewertet.

Dabei bedeutet:



23.3.2 Modifizierter Immundiffusionstest

Um den Einfluß von pH-Wert und den Effektoren Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 auf die antigene Struktur der L-LDH-asen von L.casei und L.curvatus zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung des Agarose-Gels geändert.

Zu diesem Zweck wurde der pH mit Acetat-Puffer (0,04 M) auf pH 5,5, mit Imidazol-Puffer (0,04 M) auf pH 7,2 und mit Tris-Puffer auf pH 8,8 im Agarose-Gel eingestellt. Die Effektoren Mn^{2+} ($MnSO_4$) und Fru-1,6-P₂ (Trinatriumsalz) wurden in einer 2 mM Konzentration eingesetzt.

Für diese Experimente wurden dabei die gereinigten Enzyme sowohl im denaturierten (monomeren) wie im nativen (tetrameren) Zustand herangezogen. Dissoziation in Monomere erfolgte durch 15 bzw. 60 h Dialyse bei pH 8,8 (L.casei) bzw. bei pH 7,8 (L.curvatus). Die Lösungen der nativen Enzyme enthielten zur Stabilisierung des tetrameren Zustandes in 0,01 M Imidazol-Puffer pH 6,5 zusätzlich 6 mM $MnSO_4$ und 1 mM Fru-1,6-P₂ (Mayr, 1977).

TEIL I

Immunologische Studien an allosterisch regulierbaren und nicht regulierbaren L-Laktatdehydrogenasen verschiedener Milchsäurebakterien

1. Einleitung

Die serologischen Untersuchungen von Gasser und Gasser (1971) mit Antiseren gegen D- und L-LDH-asen verschiedener Thermo- und Betabakterien lassen außerhalb der Gattung *Lactobacillus* nur bei den D-LDH-asen von *Leuconostoc*-stämmen immunologisch erfaßbare Homologien erkennen, die für eine engere phylogenetische Beziehung dieser Gattung zu jener der Laktobazillen sprechen. Mit den ebenfalls daraufhin geprüften Stämmen aus den Gattungen der Streptokokken, Pediokokken, Mikrobakterien, Bifidobakterien und Butyribakterien konnten keine Immunreaktionen festgestellt werden.

Demgegenüber wurden enge Beziehungen der Laktobazillen zu den Streptokokken und Pediokokken aufgrund enzymatischer und immunologischer Studien an Malatenzymen und Fru-1,6-P₂-Aldolasen offenkundig. So erweisen sich die Malatenzyme von *Sc.faecalis* und *L.casei* als sehr ähnlich (London et al., 1971 a; London et al., 1971 b); ebenso zeigen sich die Fru-1,6-P₂-Aldolasen von den Streptokokken aus der Serogruppe D, von den Pediokokken und von *L.casei* immunologisch auffallend homolog (London und Kline, 1973; London und Chace, 1976).

Die Ähnlichkeit in bezug auf die Fru-1,6-P₂-Aldolasen der genannten Organismen spricht sogar für eine engere Verwandtschaft von *L.casei* mit den Strepto- und Pediokokken als mit den morphologisch ähnlicheren Thermo- und Betabakterien (London und Chace, 1976).

Um eine direkte Verbindung zwischen den Ergebnissen, die aus den serologischen Studien mit D- bzw. L-LDH-asen von Gasser und Gasser (1971) und denen, die mit Aldolasen und Malatenzymen von der Arbeitsgruppe um London gewonnen wurden, herstellen zu können, werden in der vorliegenden Arbeit die immunologischen Ähnlichkeitsbeziehungen der L-LDH-asen der Streptobakterien sowohl zu denen der Thermo- und Betabakterien als auch zu denen der Strepto- und Pediokokken untersucht.

In diesem Zusammenhang soll auch geklärt werden, ob eine bevorzugte immunologische Ähnlichkeit zwischen den allosterisch regulierbaren bzw. zwischen den nicht regulierbaren L-LDH-asen besteht.

Als Antigene wurden zwei durch Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 regulierbare L-LDH-asen (von *L.casei* ssp. *casei* ATCC 393 und von *L.curvatus* DSM 20010) sowie eine nicht regulierbare L-LDH (von *L.plantarum* ssp. *plantarum* ATCC 14917) herangezogen.

Da aufgrund der unterschiedlichen pH-Dissoziierbarkeit der regulierbaren L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus* (Mayr, 1977) zu befürchten war, daß diese L-LDH-asen im Standard-Immundiffusionstest in verschiedenen Quartärzuständen mit den Antikörpern reagieren, mußte zuerst geprüft werden, inwieweit der antigene Charakter dieser L-LDH-asen vom jeweiligen Quartärzustand abhängt, um Fehlinterpretationen bei der Auswertung der vergleichenden Immuntests zu vermeiden.

Eingehende Studien über das Assoziations- Dissoziationsverhalten der L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus* in Verbindung mit der allosterischen Regulierbarkeit dieser Enzyme deckten folgende Zusammenhänge auf (Mayr, 1977):

Bei der L-LDH von *L.curvatus* wird die Stabilität des tetrameren Zustandes durch das gleiche Wechselspiel von pH-Wert und Effektoren gewährleistet, wie die des aktiven Zustandes. So garantieren sowohl schwach saure pH-Werte (pH 5,0 - 5,5) auch ohne Effektoren sowohl den tetrameren wie den aktiven Zustand dieser L-LDH, während bei neutralem pH die Anwesenheit der Effektoren Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 für die Enzymaktivität und damit auch für den tetrameren Zustand unbedingte Voraussetzung ist.

Der tetramere Zustand der L-LDH von *L.casei* erweist sich dagegen wesentlich pH-stabiler als die Aktivität. Eine pH-induzierte Dissoziation tritt erst bei drastisch höheren pH-Werten als pH 7,4 auf, während auch bei neutralem pH keine enzymatische Aktivität - wie bei der L-LDH von *L.curvatus* - mehr meßbar ist. Erst um pH 9,0 können schließlich auch hier nur Monomere nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen war zu erwarten, daß unter den Bedingungen des Standard-Immundiffusionstests (pH 7,1) die *L.casei* L-LDH zwar als Tetramer, die *L.curvatus* L-LDH aber als Monomer vorliegt. Bei unterschiedlicher Antigenität der Tetrameren und Monomeren ein und derselben L-LDH können damit die nur abstammungsgeschichtlich bedingten Veränderungen der Proteinoberfläche dieser L-LDH nicht erkannt werden.

2. Ergebnisse

2.1 Charakterisierung der antigenen Eigenschaften der L-LDH-asen von L.curvatus und L.casei im Immundiffusionstest

Durch Immunisierung von Kaninchen wurden gegen die möglichst nativen Formen der L-LDH-asen von L.curvatus und L.casei Antikörper hergestellt. Hierfür wurden die Enzyme vor jeder Injektion 48 h gegen 0,01 M Acetat-Puffer pH 5,3 dialysiert; diese Protonenkonzentration vermag bei beiden L-LDH-asen auch ohne die Anwesenheit von zweiwertigen Metallionen, deren Injektion den Wirbeltierorganismus evtl. schädigen könnte, den tetrameren, aktiven Zustand zu stabilisieren (Mayr, 1977).

Trotz dieser Vorbehandlung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß speziell die pH-labile L.curvatus L-LDH im schwach basischen Milieu des Kaninchenblutes (ca. pH 7,4) einer Dissoziation in Monomere unterliegt, so daß hier die Antikörper gegen die Monomere gebildet werden.

2.1.1 Prüfung auf Veränderung der antigenen Eigenschaften der Enzymproteine während der Reinigung

Durch einen Vergleich der antigenen Eigenschaften der im Rohextrakt enthaltenen L-LDH-asen mit denen der gereinigten Enzyme sollten Hinweise auf etwaige, durch die Reinigung bedingte Veränderungen der Enzymproteine erhalten werden.

Die Prüfung erfolgte im Standard-Immundiffusionstest (pH-Wert des Agarose-Gels: pH 7,1). Die Proteinlösungen der Rohextrakte (pH 5,5) und die der gereinigten Enzyme (pH 6,5) enthielten zur Stabilisierung des tetrameren, aktiven Zustandes 1 mM Fru-1,6-P₂ und 6 mM Mn²⁺ (Mayr, 1977).

Wie Abb. 1a) zeigt, spornt mit anti-L.casei L-LDH die gereinigte L.casei L-LDH deutlich gegen die L.curvatus L-LDH. Mit anti-L.curvatus L-LDH ist der Sporn - wenn auch deutlich schwächer - umgekehrt gerichtet (Abb. 1b)).

Es fällt auf, daß die *L.curvatus* L-LDH relativ diffuse, die *L.casei* L-LDH dagegen sehr scharfe Präzipitationszonen ausbildet.

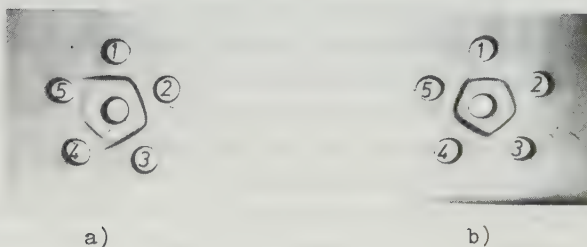


Abb. 1a) und b):

Vergleich der Immunreaktionen der gereinigten und der im Rohextrakt enthaltenen L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus*.

a) Immunreaktionen mit anti-*L.casei* L-LDH

b) Immunreaktionen mit anti-*L.curvatus* L-LDH

In die seitlichen Probenkammern wurden von *L.casei* Rohextrakt (1;3) und gereinigtes Enzym (2) bzw. von *L.curvatus* Rohextrakt (5) und gereinigtes Enzym (4) eingesetzt; die zentrale Probenkammer enthielt das Antiserum.

Setzt man eine hinsichtlich der L-LDH-Aktivität äquivalente Menge an Rohextrakt von *L.curvatus* und *L.casei* ein, so ergeben sich Präzipitate, die sich von denen der gereinigten Enzyme nicht unterscheiden (Abb. 1a) und b)). Bei keinem der beiden Enzyme läßt sich somit eine durch die Isolierung hervorgerufene Veränderung der antigenen Eigenschaften erkennen.

2.1.2 Vergleich der Immunreaktionen von tetrameren und renaturisierungsfähigen monomeren L-LDH-Formen

Es wurden renaturisierungsfähige monomere und tetramere L-LDH-Formen in den gleichen Versuchsansatz eingesetzt und im Agarose-Gel entweder Bedingungen geschaffen, die die tetrameren L-LDH-Formen stabilisieren, ohne zu einer raschen Reassoziierung der eingesetzten monomeren L-LDH-Formen zu führen, oder die das Gleichgewicht drastisch in eine Richtung verschieben, so daß im Gel des Immundiffusionstests praktisch nur eine L-LDH-Form, nämlich das Monomer oder das Tetramer, vorliegt.

Zu diesem Zweck wurde der pH-Wert des Gelpuffers im Bereich von pH 5,5 - 8,8 bei An- bzw. Abwesenheit der Effektoren Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 variiert.

Die eingesetzten Enzymlösungen der tetrameren Formen enthielten in 0,01 M Imidazol-Puffer (pH 6,5) 1 mM Fru-1,6- P_2 und 6 mM Mn^{2+} .

Die monomeren L-LDH-Formen von *L.curvatus* und *L.casei* wurden entsprechend den Hybridisierungsversuchen (Mayr, 1977) durch 15 h Dialyse gegen pH 7,8 (*L.curvatus*) bzw. pH 8,8 (*L.casei*) hergestellt und direkt in das Agarose-Gel eingesetzt. Wie Versuche von Mayr (1977) zeigen, sind die Enzyme nach dieser unter schonenden Bedingungen durchgeführten Dissoziation noch zu 100 bzw. 65 % reaktivierbar.

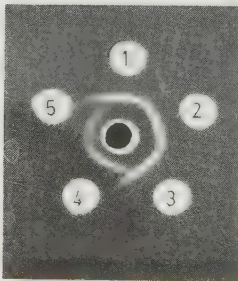
Zum besseren Verständnis werden die Ergebnisse der Immundiffusionsexperimente sowohl schematisch in Abb. 5 und 7 als auch in dem von Gasser und Gasser (1971) vorgeschlagenen hierarchischen System in Abb. 6 und 8 dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Abb. 5 und 7 8 Probenkammern für die Antigenlösungen um eine zentrale, das jeweilige Antiserum aufnehmende Probenkammer angeordnet, um einen Vergleich der 4 verschiedenen Antigene gegeneinander für eine bestimmte Testbedingung auf einen Blick zu ermöglichen, während im Experiment nur je 5 äquidistante Löcher für die Antigenlösungen ausgestanzt wurden, um eine genauere Auswertung der Immunreaktionen zu gewährleisten.

2.1.2.1 Verhalten gegenüber anti-L.casei L-LDH

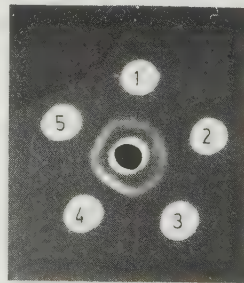
2.1.2.1.1 Testbedingungen, die den monomeren Zustand begünstigen

Die Immundiffusionstests wurden mit einem Gelpuffer von pH 8,8 durchgeführt, bei einem pH-Wert also, der eine Dissoziation der L-LDH-Asen von *L.curvatus* und *L.casei* in Monomere bedingt, wie entsprechende Sedimentationsanalysen beweisen (Mayr, 1977).

Die im monomeren und tetrameren Zustand eingesetzte L-LDH von *L.curvatus* ergibt ebenso wie die im monomeren und tetrameren Zustand eingesetzte L-LDH von *L.casei* relativ diffuse konfluente Präzipitationszonen (Abb. 2a)). Beide Formen der *L.casei* L-LDH spornen deutlich gegen die der *L.curvatus* L-LDH.



a)



b)

Abb. 2a) und b):

Immundiffusionstest bei pH 8,8 ohne Effektoren im Agarose-Gel

a) mit anti-*L.casei* L-LDH

b) mit anti-*L.curvatus* L-LDH

In die Probenkammern wurden folgende Antigene eingesetzt:

(1) und (3): tetramere L-LDH von *L.casei*

(2): renaturierungsfähige monomere L-LDH von *L.casei*

(4): tetramere L-LDH von *L.curvatus*

(5): renaturierungsfähige monomere L-LDH von *L.curvatus*

Die zentrale Probenkammer enthielt das Antiserum.

2.1.2.1.2 Testbedingungen, die den tetrameren Zustand begünstigen

Wie aus den Arbeiten von Mayr (1977) hervorgeht, ist der tetramere Zustand der L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.casei* bei pH 5,5 sowohl mit als auch ohne die Effektoren stabil. Aufgrund der ausgeprägten Reassoziierungsfähigkeit der beiden, unter den beschriebenen Bedingungen dissoziierten L-LDH-asen sollte man also bei diesem pH-Wert im Gel einheitlich Tetramere erwarten, unabhängig davon, ob Monomere oder Tetramere in das Agarose-Gel eingesetzt werden.

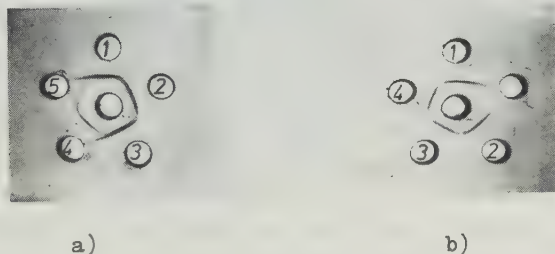


Abb. 3a) und b):

Immundiffusionstest bei pH 5,5 mit Effektoren im Agarose-Gel

a) mit anti-*L.casei* L-LDH

b) mit anti-*L.curvatus* L-LDH

In die Probenkammern wurden folgende Antigene eingesetzt:

- a): (1) und (3): tetramere L-LDH von *L.casei*
(2): renaturierungsfähige monomere L-LDH von *L.casei*
(4): tetramere L-LDH von *L.curvatus*
(5): renaturierungsfähige monomere L-LDH von *L.curvatus*
- b): (1): tetramere L-LDH von *L.casei*
(2): renaturierungsfähige monomere L-LDH von *L.casei*
(3): tetramere L-LDH von *L.curvatus*
(4): renaturierungsfähige monomere L-LDH von *L.curvatus*

Die zentrale Probenkammer enthielt das Antiserum.

Wie Abb. 3a) zeigt, bildet die *L.curvatus* L-LDH, gleichgültig, ob Monomere oder Tetramere eingesetzt werden, bei pH 5,5 mit Effektoren im Gel tatsächlich konfluente Präzipitationszonen aus, die zudem scharf begrenzt sind.

Auch ohne Effektoren ergeben sich konfluente Präzipitationszonen, doch sind hier die Präzipitationszonen ebenso diffus, wie bei den Reaktionen der monomeren L-LDH-Formen bei pH 8,8 (Abb. 2, Abb. 5).

Im Fall der *L.casei* L-LDH hängt demgegenüber die Schärfe der Präzipitationszonen nicht von der An- bzw. Abwesenheit der Effektoren im Gel ab: Bei pH 5,5 mit oder ohne Effektoren können mit mono- oder tetramerer L-LDH einheitlich nur scharf begrenzte konfluente Präzipitationszonen beobachtet werden. In allen Fällen spornt auch unter diesen Bedingungen die *L.casei* L-LDH gegen die *L.curvatus* L-LDH (Abb. 3a), Abb. 5, Abb. 6).

2.1.2.1.3 Testbedingungen, unter denen Tetramere und Monomere nebeneinander vorliegen können

In diesen Experimenten wurde für den Gelpuffer ein pH-Wert von 7,2 gewählt. Bei dem zwischen den Extremwerten pH 5,5 und pH 8,8 liegenden pH-Wert könnte am ehesten die Voraussetzung dafür gegeben sein, daß monomere und tetramere L-LDH-Formen im gleichen Versuchsansatz nebeneinander erhalten bleiben, so daß die antigenen Eigenschaften der entsprechenden Oligomerenform direkt miteinander verglichen werden können.

Im Immuntest bei pH 7,2 ohne Effektoren verhalten sich die im monomeren und tetrameren Zustand eingesetzten *L.curvatus* L-LDH-Formen identisch: Es zeigen sich relativ diffuse Präzipitationszonen, die ohne Sporn ineinander übergehen.

Bei pH 7,2 mit Effektoren ist die Präzipitationszone der *L.curvatus* L-LDH-Tetrameren deutlich schärfer begrenzt als die der Monomeren. Zu einer erkennbaren Spornbildung zwischen diesen beiden Präzipitationszonen kommt es jedoch nicht (Abb. 5, Abb. 6).

Dagegen wird ein deutlicher Unterschied in der Immunreaktion zwischen den im monomeren und tetrameren Zustand eingesetzten L.casei L-LDH-Formen sichtbar: In An- bzw. Abwesenheit der Effektoren richten beide L-LDH-Formen gegeneinander einen deutlichen Doppelsporn. Wie in Abb. 4 zu erkennen ist, tritt dabei mit monomerer L.casei L-LDH eine diffuse, mit tetramerer L.casei L-LDH eine sehr scharfe Präzipitationszone auf. In allen Fällen spornt die L.casei L-LDH gegen die L.curvatus L-LDH (Abb. 5, Abb. 6).

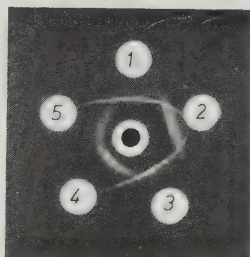


Abb. 4:

Immundiffusionstest bei pH 7,2 ohne Effektoren im Agarose-Gel mit anti-L.casei L-LDH

In die Probenkammern wurden folgende Antigene eingesetzt:

- (1) und (3): tetramere L-LDH von L.casei
- (2): renaturierungsfähige monomere L-LDH von L.casei
- (4): tetramere L-LDH von L.curvatus
- (5): renaturierungsfähige monomere L-LDH von L.curvatus

Die zentrale Probenkammer enthielt das Antiserum.

Bedingungen im Agarosegel		Immunreaktionen	
pH	Effektoren- zusatz	anti-L. casei L-LDH	anti-L. curvatus L-LDH
5,5	-		
	+		
7,2	-		
	+		
8,8	-		

Abb. 5:

Unmittelbares, in schematischer Form dargestelltes Ergebnis der unter verschiedenen Bedingungen im Agarose-Gel durchgeführten Immunreaktionen von tetrameren und renaturierungsfähigen monomeren L-LDH-Formen von *L. casei* und *L. curvatus* mit anti-*L. casei* L-LDH und anti-*L. curvatus* L-LDH

— scharf begrenzte Präzipitationszone

- - - diffuse Präzipitationszone

ca_T = *L. casei* L-LDH (im tetrameren Zustand eingesetzt)

ca_M = *L. casei* L-LDH (im monomeren Zustand eingesetzt)

cu_T, cu_M = entsprechende L-LDH-Formen von *L. curvatus*

AS = Antigenum

Bedingungen im Agarosegel		Immunreaktionen	
pH	Effektoren- zusatz	anti-L.casei L-LDH	anti-L.curvatus L-LDH
5,5	-	$ \begin{array}{c} ca_T \\ = \quad ca_M \\ \uparrow \quad \uparrow \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad = \quad cu_M \end{array} $	$ \begin{array}{c} cu_M \\ = \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad ca_M \\ \uparrow \quad \uparrow \quad = \quad ca_T \end{array} $
	+	$ \begin{array}{c} ca_T \\ = \quad ca_M \\ \uparrow \quad \uparrow \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad = \quad cu_M \end{array} $	$ \begin{array}{c} cu_M \\ = \quad cu_T \\ = \quad = \quad ca_M \\ = \quad = \quad = \quad ca_T \end{array} $
7,2	-	$ \begin{array}{c} ca_T \\ \otimes \quad ca_M \\ \uparrow \quad \uparrow \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad = \quad cu_M \end{array} $	$ \begin{array}{c} cu_M \\ = \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad ca_M \\ \uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \quad ca_T \end{array} $
	+	$ \begin{array}{c} ca_T \\ \otimes \quad ca_M \\ \uparrow \quad \uparrow \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad = \quad cu_M \end{array} $	$ \begin{array}{c} cu_M \\ = \quad ca_M \\ \uparrow \quad = \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad = \quad ca_T \end{array} $
8,8	-	$ \begin{array}{c} ca_T \\ = \quad ca_M \\ \uparrow \quad \uparrow \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad = \quad cu_M \end{array} $	$ \begin{array}{c} cu_M \\ = \quad cu_T \\ \uparrow \quad \uparrow \quad ca_M \\ \uparrow \quad \uparrow \quad = \quad ca_T \end{array} $

Abb. 6:

Darstellung der in Abb. 5 gezeigten Ergebnisse der Immunreaktionen verschiedener L-LDH-Formen von L.casei und L.curvatus unter Verwendung der für die entsprechenden Reaktionen üblichen Symbole (Gasser und Gasser, 1971)

2.1.2.1.4 Interpretation der Immunreaktionen

Da mit den verschiedenen L-LDH-Formen von *L.curvatus* und *L.casei* gegen das gleiche Antiserum sowohl scharfe wie diffuse Präzipitationszonen erhalten werden, liegt die Vermutung nahe, daß die Ausbildung unterschiedlich scharf begrenzter Präzipitationszonen allein vom jeweiligen Tertiär- bzw. Quartärzustand des Antigens abhängt.

Bemerkenswerterweise können scharf begrenzte Präzipitationslinien nur unter den Bedingungen beobachtet werden, unter denen man aufgrund entsprechender Sedimentationsanalysen (Mayr, 1977) eine Stabilisierung des tetrameren Zustandes der jeweiligen L-LDH erwartet. Es bietet sich an, scharf begrenzte Präzipitationszonen als Ausdruck einer sehr einheitlichen tetrameren L-LDH-Form aufzufassen.

Andererseits müssen diffuse Präzipitationszonen als Zeichen einer gewissen Heterogenität der jeweiligen Antigenpopulation gewertet werden. Für die unscharfen Präzipitationszonen der im monomeren Zustand eingesetzten L-LDH von *L.curvatus* und *L.casei* bei pH 8,8 im Gel ist möglicherweise eine Inhomogenität im Tertiärzustand der unter diesen pH-Bedingungen stabilen L-LDH-Monomeren verantwortlich, während unter den Bedingungen, die keine einheitliche Oligomerenform zu stabilisieren vermögen, eher eine Inhomogenität des Quartärzustandes für die Ausbildung unscharfer Präzipitationszonen verantwortlich sein dürfte.

Im Fall der *L.curvatus* L-LDH spricht die scharf begrenzte Präzipitationszone bei pH 5,5 mit Effektoren dafür, daß die im monomeren und tetrameren Zustand eingesetzten Enzymformen ebenso wie die im tetrameren Zustand eingesetzte L-LDH bei pH 7,2 mit Effektoren im Gel als einheitliche Tetramere mit dem Antiserum reagieren; denn sowohl bei pH 5,5 als auch bei pH 7,2 jeweils mit Effektoren können aufgrund von Sedimentationsanalysen einheitliche Tetramere nachgewiesen werden (Mayr, 1977).

Die diffusen Präzipitationszonen bei pH 7,2 ohne Effektoren lassen den Schluß zu, daß beide L-LDH-Formen von *L.curvatus* in einem

weniger definierten Zustand mit den Antikörpern reagieren. Die im monomeren Zustand eingesetzte L-LDH liegt vermutlich auch im Gel als Monomer vor, da auch die Ergebnisse entsprechender Sedimentationsanalysen bei neutralem bis schwach basischem pH-Wert ohne Effektoren die Existenz von Monomeren belegen (Mayr, 1977). Die unscharfe Präzipitationszone wäre in diesem Fall auf eine Inhomogenität in der Tertiärstruktur der Monomeren zurückzuführen, während für die diffuse Präzipitationszone der im tetrameren Zustand eingesetzten L-LDH evtl. zusätzlich das Vorliegen verschiedener Oligomerenformen verantwortlich wäre. Offensichtlich werden im letzteren Fall die in der Lösung der L-LDH-Tetrameren enthaltenen Effektoren während des Diffusionsvorganges soweit verdünnt, daß sie den tetrameren Zustand der L-LDH nicht mehr stabilisieren können.

Andererseits sind im Test bei pH 7,2 mit Effektoren die im Gel-puffer vorliegenden Effektoren nicht in der Lage, die im monomeren Zustand eingesetzte L.curvatus L-LDH vollständig zu renaturieren, wie hier die diffuse Präzipitationszone zeigt. Dementsprechend deuten bei pH 5,5 ohne Effektoren die unscharfen Präzipitationszonen der im monomeren und tetrameren Zustand eingesetzten L.curvatus L-LDH darauf hin, daß hier nicht die gleiche einheitliche L-LDH-Form wie bei pH 5,5 mit Effektoren vorliegt. Möglicherweise tritt unter den später noch zu diskutierenden Verhältnissen der Immundiffusionsexperimente eine Dissoziation in Di- und Monomere auf, obwohl entsprechende Sedimentationsanalysen bei pH 5,5 ohne Effektoren für stabile L.curvatus L-LDH-Tetramere sprechen (Mayr, 1977).

Ein ähnlich enger Zusammenhang zwischen der Schärfe der Präzipitationszone und dem Vorliegen verschiedener Oligomerenformen läßt sich auch bei den Reaktionen der L.casei L-LDH erkennen. Ausschließlich scharfe Präzipitationszonen bildet die L.casei L-LDH unter Testbedingungen, die die tetramere Form stabilisieren, wie bei pH 5,5 mit und ohne Effektoren.

Im Test bei pH 7,2 mit und ohne Effektoren bleibt die Präzipitationszone dagegen nur dann scharf begrenzt, wenn tetramere

L.casei L-LDH eingesetzt wird, während sich mit der im monomeren Zustand eingesetzten L-LDH eine diffuse Präzipitationszone ergibt. Letztere ist wohl ein Hinweis darauf, daß unter diesen pH-Bedingungen auch bei Anwesenheit der Effektoren keine vollständige Renaturierung zu Tetrameren stattgefunden hat.

Die Ausbildung eines Doppelsporns zwischen der als Monomer und Tetramer eingesetzten L-LDH zeigt, daß qualitative Unterschiede im antigenen Charakter der tetrameren und monomeren bzw. noch nicht vollständig renaturierten L-LDH von L.casei bestehen. Dies bedeutet aber auch, daß die während der Immunisierung vorliegende antigene Form der L.casei L-LDH Determinanten besitzt, die für die Tetrameren und Monomeren bzw. für die noch nicht voll renaturierten Oligomerenformen spezifisch sind.

Als antigene Form wäre entweder eine Intermediärform zwischen Mono- und Tetramer oder auch verschiedene Oligomerenformen - Mono-, Di- und Tetramer - bzw. verschiedene Konformationszustände einer Oligomerenform nebeneinander denkbar.

Der Sporn der im monomeren Zustand eingesetzten L-LDH gegen die im tetrameren Zustand eingesetzte L-LDH muß wohl dahingehend interpretiert werden, daß die Monomeren bzw. die noch nicht vollständig renaturierten Oligomerenformen antigene Determinanten aufweisen, die bei der Aggregation zu nativen Tetrameren verdeckt, oder so verändert werden, daß sie für die Antigen-Antikörper-Reaktion nicht mehr zugänglich sind.

Der Sporn in umgekehrter Richtung läßt sich damit erklären, daß in den Tetrameren tertiär- und/oder quartärstrukturspezifische Determinanten auftreten, die in Quartärzuständen niedrigeren Oligomeregrades noch nicht vorhanden sind.

Aufgrund der Ergebnisse der einzelnen Immuntests mit anti-L.casei L-LDH läßt sich eine Abnahme der Ähnlichkeit der L-LDH-Oligomerenformen von L.curvatus und L.casei von der antigenen Form der L.casei L-LDH, wie sie während der Immunisierung vorliegt, in folgender Reihe erkennen:

{	L.casei L-LDH-Tetramer	}
	L.casei L-LDH-Monomer bzw. eine noch nicht vollständig renaturierte intermediäre Oligomerenform	
> {L.curvatus L-LDH-Tetramer = L.curvatus L-LDH-Monomer}		

2.1.2.2 Verhalten gegenüber anti-L.curvatus L-LDH

2.1.2.2.1 Testbedingungen, die den monomeren Zustand begünstigen

Im Immundiffusionstest bei pH 8,8 lassen sich mit allen eingesetzten Antigenen ebenso wie im Test gegen anti-L.casei L-LDH nur relativ diffuse Präzipitationszonen (Abb. 2b)) erkennen. Auch gegen anti-L.curvatus L-LDH bilden die Präzipitate der im monomeren und tetrameren Zustand eingesetzten L-LDH-Formen konfluente Zonen. Während aber im Test mit anti-L.casei L-LDH die L.casei L-LDH deutlich gegen die L.curvatus L-LDH spornt (Abb. 2a)), ist mit anti-L.curvatus L-LDH nur ein schwacher Sporn der L-LDH von L.curvatus gegen die von L.casei sichtbar (Abb. 2b)).

2.1.2.2.2 Testbedingungen, die den tetrameren Zustand begünstigen

Wie mit anti-L.casei L-LDH weist die im tetrameren und monomeren Zustand eingesetzte L.curvatus L-LDH bei pH 5,5 ohne Effektoren diffuse, bei pH 5,5 mit Effektoren dagegen scharfe, konfluente Präzipitationszonen auf.

Die im mono- und tetrameren Zustand eingesetzten L.casei L-LDH-Formen zeigen mit anti-L.curvatus L-LDH ebenso wie im Test mit anti-L.casei L-LDH keine Beeinflussung durch die im Gel enthaltenen Effektoren und ergeben in allen Tests scharfe konfluente Präzipitationszonen.

Während jedoch bei pH 5,5 ohne Effektoren die L.curvatus L-LDH einen Sporn gegen die L.casei L-LDH richtet, verhalten sich alle L-LDH-Formen von L.curvatus und L.casei bei pH 5,5 mit Effektoren homoimmun (Abb. 3b), Abb. 5, Abb. 6).

2.1.2.2.3 Testbedingungen, unter denen Tetramere und Monomere nebeneinander vorliegen können

Die im mono- und tetrameren Zustand eingesetzten L.curvatus L-LDH-Formen verhalten sich entsprechend den Immuntests mit anti-L.casei L-LDH auch mit anti-L.curvatus L-LDH bei pH 7,2 ohne Effektoren homoimmun. Auch hier sind die Präzipitationszonen relativ diffus (Abb. 5).

Die Reaktionen beider L-LDH-Formen unterscheiden sich dagegen bei pH 7,2 mit Effektoren im Gel deutlich voneinander. Die Präzipitationszone von L.curvatus L-LDH-Monomeren erscheint diffus und spornet gegen die scharf begrenzte Präzipitationszone der im tetrameren Zustand eingesetzten L.curvatus L-LDH (Abb. 5).

Die Reaktionen der im mono- und tetrameren Zustand eingesetzten L.casei L-LDH-Formen lassen sich ähnlich wie im Test mit anti-L.casei L-LDH gut voneinander unterscheiden, jedoch tritt mit anti-L.curvatus L-LDH jetzt ein einfacher Sporn von den Monomeren gegen die Tetrameren auf.

Auch mit anti-L.curvatus L-LDH bleibt die Präzipitationszone von der im monomeren Zustand eingesetzten L.casei L-LDH sowohl in An- wie Abwesenheit der Effektoren diffus, während die Reaktion mit der im tetrameren Zustand eingesetzten L-LDH wieder eine scharfe Präzipitationslinie ergibt (Abb. 5).

Bei pH 7,2 ohne Effektoren spornet die L.curvatus L-LDH einheitlich gegen die L.casei L-LDH-Formen, während bei pH 7,2 mit Effektoren die im tetrameren Zustand eingesetzte L-LDH von L.casei und L.curvatus ebenso wie die im monomeren Zustand eingesetzten L-LDH-asen beider Organismen homoimmune Reaktionen zeigen.

Überraschenderweise gehen bei pH 7,2 mit Effektoren die Präzipitationszonen von L.casei L-LDH-Monomeren und L.curvatus L-LDH-Tetrameren ohne Spornbildung ineinander über. Da einerseits die im tetrameren Zustand eingesetzte L-LDH von L.casei und L.curvatus homoimmune Reaktionen ergeben, andererseits aber die im monomeren Zustand eingesetzte L.casei L-LDH gegen die als Tetramer einge-

setzte L.casei L-LDH spornt, sollte auch ein Sporn von der im monomeren Zustand eingesetzten L.casei L-LDH gegen die im tetrameren Zustand eingesetzte L.curvatus L-LDH zu erwarten sein. Die Reaktion ist aber offensichtlich zu schwach, als daß sie hätte erkannt werden können.

2.1.2.2.4 Interpretation der Immunreaktionen

Wie die Ergebnisse der Immundiffusionstests mit anti-L.curvatus L-LDH zeigen, bilden die L-LDH-asen von L.casei und L.curvatus unter den gleichen Testbedingungen scharfe bzw. diffuse Präzipitationszonen aus wie mit anti-L.casei L-LDH. Die Beobachtung, daß diese für die einzelne L-LDH charakteristischen Reaktionen auch unabhängig von der Art des Antiserums unter den entsprechend gewählten Testbedingungen auftreten, bestätigt die Vorstellung, daß diese spezifischen Immunreaktionen als Ausdruck der verschiedenen durch pH-Wert und Effektoren veränderbaren Quartärzustände (bzw. Tertiärzustände) der Antigene zu verstehen sind.

Einen Überblick über die vermutlich vorliegenden Oligomerenzustände der L-LDH-asen von L.casei und L.curvatus unter den gewählten Testbedingungen in Abhängigkeit vom jeweiligen Oligomerenzustand, in dem die Enzyme in die Immundiffusionstests eingesetzt wurden, gibt Tab. 1 .

Erwartungsgemäß entsprechen die Immunreaktionen der im tetrameren Zustand eingesetzten L-LDH von L.casei und L.curvatus im Standard-Immundiffusionstest bei pH 7,1 (Phosphat-Puffer) denen, die in den modifizierten Immundiffusionstest bei pH 7,2 (Imidazol-Puffer) ohne Effektoren beobachtet werden (L.curvatus L-LDH: diffuse Präzipitationszone; L.casei L-LDH: scharfe Präzipitationszone; Abb. 1, Abb. 4, Abb. 5).

Man kann somit davon ausgehen, daß auch im Standard-Immundiffusionstest, der für die vergleichenden immunologischen Studien der L-LDH-asen aus der Familie der Milchsäurebakterien herangezogen wurde, im Fall der L.curvatus L-LDH Monomere oder ein nicht näher definierbares Oligomeregemisch, im Fall der L.casei L-LDH eine

Tab. 1:

überblick über die unter den jeweils gewählten Testbedingungen mutmaßlich vorliegenden Oligomerenzustände der L-LDH-Asen von L.casei und L.curvatus in Abhängigkeit vom Quartärstrukturzustand der in den Immundiffusionstest eingesetzten Enzyme

pH	Mn ²⁺ + Fru ⁻¹ , 6-P ₂ im Agarose-Gel	Quartärstrukturzustand der eingesetzten L-LDH von L.curvatus	Quartärstrukturzustand der eingesetzten L-LDH von L.casei
8,8	-	Tetramer	Monomer ¹⁾
		Monomer	Monomer
	+	Tetramer	Monomer
		Monomer ²⁾	Monomer ²⁾
7,2	-	Monomer ²⁾	Monomer
	+	Tetramer	Monomer ²⁾
5,5	-	Monomer ²⁾	Monomer ²⁾
	+	Tetramer	Tetramer
	-	Monomer ²⁾	Monomer ²⁾

¹⁾ nach 15 h Dialyse gegen Dissoziationspuffer; ²⁾ bzw. Gemisch verschiedener Oligomerenformen

einheitliche Tetramerenform mit dem Antiserum reagiert.

Die Spornbildung von monomerer *L. curvatus* L-LDH gegen tetramere *L. curvatus* und *L. casei* L-LDH spricht dafür, daß nicht gegen die *L. curvatus* L-LDH-Tetrameren immunisiert wurde, wie sie im Test bei pH 7,2 mit Effektoren vorliegen. Die antigene Form der *L. curvatus* L-LDH, wie sie während der Immunisierung vorliegt, muß mehr Gemeinsamkeiten mit den *L. curvatus* L-LDH-Monomeren als mit den entsprechenden Tetrameren besitzen.

Aufgrund der Dissoziation der *L. curvatus* L-LDH im Neutralen kann es als sehr wahrscheinlich angesehen werden, daß die Antikörper im Wirbeltierorganismus gegen die *L. curvatus* L-LDH-Monomeren gebildet wurden.

In den *L. curvatus* L-LDH-Tetrameren müssen durch Zusammenlagerung der Monomeren oder/und durch entsprechende Umfaltungen unter dem Einfluß von pH und Effektoren spezifische Monomer-Determinanten für die Antigen-Antikörper-Reaktion unzugänglich geworden sein. Die Tatsache, daß sich die *L. curvatus* und *L. casei* L-LDH-Tetrameren bei pH 7,2 mit Effektoren gegen anti-*L. curvatus* L-LDH gleich verhalten, die *L. casei* L-LDH-Monomeren aber einen Sporn gegen die *L. casei* L-LDH-Tetrameren richten, kann nur bedeuten, daß bei beiden L-LDH-asen mit der Assoziation sehr ähnliche - wenn nicht gleiche - Veränderungen der Oberflächenstruktur stattfinden.

Aufgrund der Ergebnisse der einzelnen Immuntests mit anti-*L. curvatus* L-LDH läßt sich eine Abnahme der Ähnlichkeit von der antigenen Form der *L. curvatus* L-LDH, wie sie während der Immunisierung vorliegt, in der folgenden Reihe erkennen:

L. curvatus L-LDH-Monomer $\left\{ \begin{array}{l} \text{L. casei L-LDH-Monomer bzw. eine} \\ \text{noch nicht vollständig renaturierte} \\ \text{intermediäre Oligomerenform} \end{array} \right\}$

$\left[\rightarrow \{ \text{L. curvatus L-LDH-Tetramer} = \text{L. casei L-LDH-Tetramer} \} \right]$

2.1.3 Wirkungsspezifität der Mn^{2+} -Ionen

Wie gezeigt wurde, hängt die Immunpräzipitation tetramerer und renaturierungsfähiger monomerer L.curvatus L-LDH von der An- bzw. Abwesenheit der Effektoren Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 im Gel ab. Um beweisen zu können, daß das Schwermetallion Mn^{2+} nicht auf die Struktur der Antikörper, sondern allein auf die der Antigene einwirkt und damit die Immunreaktion verändert, wurde das immunologische Verhalten der L.curvatus L-LDH in Gegenwart eines zweiwertigen Metallions geprüft, das die Struktur der L-LDH nicht zu beeinflussen vermag.

Zu diesem Zweck wurde in den Immundiffusionstest Mn^{2+} durch Mg^{2+} ersetzt, durch ein Metallion, das im Gegensatz zu Mn^{2+} bei pH 7,0 in Gegenwart von Fru-1,6- P_2 nicht den aktiven und damit wohl auch nicht den tetrameren Zustand der L.curvatus L-LDH stabilisieren kann (Mayr, 1977). Da kaum anzunehmen ist, daß - im Fall einer Metallionen-Modifizierbarkeit der Antikörper - die Struktur der Antikörper ebenso spezifisch durch Mn^{2+} -Ionen wie die der L-LDH von L.curvatus verändert werden kann, sollten auch Mg^{2+} -Ionen die Immunpräzipitationen mit der L.curvatus L-LDH in entsprechender Weise beeinflussen.

Die Immundiffusionstests wurden mit anti-L.curvatus L-LDH bei pH 5,5 und pH 7,2 jeweils unter Zugabe von 2 mM Mg^{2+} und 2 mM Fru-1,6- P_2 zum Gelpuffer durchgeführt. Untersucht wurden die immunologischen Reaktionen der im tetrameren Zustand eingesetzten L.curvatus L-LDH im Vergleich zu denen der im gleichen Zustand eingesetzten L.casei L-LDH.

In allen Fällen bildet die L.curvatus L-LDH diffuse Präzipitationszonen aus und spornt gegen die L.casei L-LDH. Die L.curvatus L-LDH verhält sich also genauso, wie in den entsprechenden Tests ohne Effektoren.

Mg^{2+} kann somit Mn^{2+} ebensowenig im Immundiffusionstest wie im Aktivitätstest ersetzen. Als Ursache für die durch Mn^{2+} in Gegenwart von Fru-1,6- P_2 veränderten Immunreaktionen der L.curvatus L-LDH kommt demnach nur ein spezifischer Einfluß der Effektoren auf den Tertiär- bzw. Quartärstrukturzustand des Antigens in Frage.

2.1.4 Vergleich der Immunreaktionen von tetrameren und nicht mehr renaturierungsfähigen monomeren L-LDH-Formen

Nicht mehr renaturierungsfähige monomere L-LDH-Formen wurden nach 60 h Dialyse gegen pH 7,8 (L.curvatus) bzw. gegen pH 8,8 (L.casei) erhalten. Nach Umstellen auf Renaturierungsbedingungen (pH 6,5 in Gegenwart von Mn^{2+} und Fru-1,6-P₂, Mayr, 1977) und 5 h Inkubation unter diesen Bedingungen ist keine Reaktivierung mehr nachweisbar.

Durch einen Vergleich der immunologischen Eigenschaften dieser irreversibel denaturierten L-LDH-Formen mit denen der renaturierungsfähigen L-LDH-Formen sollen die durch die verlängerte Dialyse bedingten zusätzlichen Veränderungen der Proteinstruktur und die daraus resultierende Unfähigkeit der Proteine zu renaturieren, serologisch nachgewiesen werden.

Zum einen wurden deshalb die Versuche unter Bedingungen durchgeführt, die einen Vergleich mit den Immunreaktionen von nur geringfügig umgefalteten Monomeren erlauben, wie sie entweder aus nativen Tetrameren während der Diffusion im Agarose-Gel entstehen (pH 7,2 ohne Effektoren: L.curvatus L-LDH) oder wie sie als noch renaturierungsfähige Monomere unter zu schwachen Renaturierungsbedingungen vorliegen (pH 7,2 ohne Effektoren: L-LDH von L.curvatus und L.casei). Zum anderen soll die Renaturierungsfähigkeit der stärker denaturierten Monomeren unter Bedingungen geprüft werden, die eine Reassoziatio renaturierungsfähiger Monomere bewirken (pH 5,5 mit Effektoren).

2.1.4.1 Verhalten gegenüber anti-L.casei L-LDH

Die durch die 60 h Dialyse denaturierte L.curvatus L-LDH bildet bei pH 5,5 mit Effektoren und bei pH 7,2 ohne Effektoren eine relativ schwer sichtbare, diffuse Präzipitationszone aus. Bei pH 5,5 mit Effektoren zeigen die in nativem tetrameren Zustand eingesetzten L-LDH-asen von L.casei und L.curvatus scharfe Präzipitationslinien und richten einen deutlichen Sporn gegen

das Präzipitat der denaturierten L.curvatus L-LDH (Abb. 7). Bei pH 7,2 ohne Effektoren spornen ebenfalls die in nativem Zustand eingesetzten L-LDH-Asen gegen die irreversibel denaturierten L-LDH-Formen von L.curvatus, wobei - entsprechend den bereits beschriebenen Ergebnissen bei pH 7,2 ohne Effektoren - die in nativem tetrameren Zustand eingesetzte L.curvatus L-LDH wieder eine diffuse Präzipitationszone erkennen läßt (Abb. 7).

Für die durch 60 h Dialyse denaturierte L-LDH von L.casei treffen die gleichen Feststellungen zu wie für die von L.curvatus, nur spornet die denaturierte L-LDH von L.casei gegen die von L.curvatus (Abb. 7, Abb. 8).

2.1.4.2 Verhalten gegenüber anti-L.curvatus L-LDH

Auch hier können sowohl bei pH 5,5 mit Effektoren als auch bei pH 7,2 ohne Effektoren nur schwache, diffuse Präzipitationszonen mit den irreversibel denaturierten L-LDH-Formen von L.curvatus und L.casei beobachtet werden. In allen Fällen spornen die im nativen, tetrameren Zustand eingesetzten L-LDH-Asen von L.casei und L.curvatus gegen die denaturierten L-LDH-Formen. Die denaturierten L-LDH-Formen von L.casei und L.curvatus können im Test mit anti-L.curvatus L-LDH - im Gegensatz zu den Immundiffusionstests mit anti-L.casei L-LDH - nicht voneinander unterschieden werden. (Abb. 7, Abb. 8).

2.1.4.3 Interpretation der Immunreaktionen

Die diffusen Präzipitationszonen der durch 60 h Dialyse gegen Dissoziationspuffer denaturierten L-LDH-Formen von L.casei und L.curvatus im Test mit anti-L.curvatus und anti-L.casei L-LDH bei pH 5,5 mit Effektoren zeigen, daß diese L-LDH-Formen unter den Testbedingungen nicht mehr zu Tetrameren reaggregieren können.

Bedingungen im Agarosegel		Zustand der eingesetzten L-LDH-Monomeren			
		renaturierungsfähig		nicht mehr renaturierungsfähig	
pH	Effektoren-zusatz	anti-L.casei L-LDH	anti-L.curvatus L-LDH	anti-L.casei-L-LDH	anti-L.curvatus L-LDH
5,5	+				
7,2	-				

Abb. 7: Unmittelbares Ergebnis der immunologischen Reaktionen noch renaturierungsfähiger monomerer und nicht mehr renaturierungsfähiger monomerer L-LDH-Formen von L.casei vatus und L.casei

— scharf begrenzte Präzipitationszone; - - - diffuse Präzipitationszone

ca_T = L.casei L-LDH (im tetrameren Zustand eingesetzt)

ca_M = L.casei L-LDH (im monomeren Zustand eingesetzt)

cu_T, cu_M = entsprechende L-LDH-Formen von L.curvatus

AS = Antiserum

Bedingungen im Agarosegel		Zustand der eingesetzten L-LDH-Monomeren			
		renaturierungsfähig		nicht mehr renaturierungsfähig	
pH	Effektoren- zusatz	anti-L.casei L-LDH	anti-L.curvatus L-LDH	anti-L.casei L-LDH	anti-L.curvatus L-LDH
5,5	+	$\begin{array}{cc} c_{QM} & \\ = & c_{QT} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{UM} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{UT} \end{array}$	$\begin{array}{cc} c_{UT} & \\ = & c_{UM} \\ = & c_{QT} \\ = & c_{QM} \end{array}$	$\begin{array}{cc} c_{QT} & \\ \uparrow & c_{UT} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{QM} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{UM} \end{array}$	$\begin{array}{cc} c_{UT} & \\ = & c_{QT} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{QM} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{UM} \end{array}$
7,2	—	$\begin{array}{cc} c_{QT} & \\ \times & c_{QM} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{UM} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{UT} \end{array}$	$\begin{array}{cc} c_{UM} & \\ = & c_{UT} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{QM} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{QT} \end{array}$	$\begin{array}{cc} c_{QT} & \\ \uparrow & c_{UT} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{QM} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{UM} \end{array}$	$\begin{array}{cc} c_{UT} & \\ \uparrow & c_{QT} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{UM} \\ \uparrow & \uparrow \\ & c_{QM} \end{array}$

Abb. 8: Darstellung der in Abb. 7 wiedergegebenen Ergebnisse der Immunreaktionen verschiedener L-IDH-Formen von L.casei und L.curvatus unter Verwendung der für die entsprechenden Reaktionen üblichen Symbole (Gasser und Gasser, 1971)

Die Ausbildung eines deutlichen Sporns von den nativen gegen die denaturierten L-LDH-Formen erlaubt weiter die Aussage, daß diese denaturierten L-LDH-Formen weniger Determinanten mit dem Antigen der L.casei bzw. der L.curvatus L-LDH gemeinsam haben, wie es während der Immunisierung vorliegt, als die tetrameren L-LDH-Formen.

Wie die Immunreaktionen der irreversibel denaturierten L.curvatus L-LDH bei pH 7,2 ohne Effektoren direkt beweisen, besitzen diese L-LDH-Formen auch weniger von den Determinanten, die mit den Antiseren erfaßbar sind, als die Monomeren, die während des Diffusionsvorganges aus den nativen L.curvatus L-LDH-Tetrameren entstehen; denn sowohl mit anti-L.casei wie mit anti-L.curvatus L-LDH spornen die aus den nativen L.curvatus L-LDH-Tetrameren entstandenen Monomeren gegen die irreversibel denaturierten monomeren L-LDH-Formen.

Daß die irreversibel denaturierten monomeren L-LDH-Formen von L.casei gegenüber den noch renaturisierungsfähigen Monomeren der L.casei L-LDH Determinanten verloren haben, zeigt ein Vergleich der Immunreaktionen von verschieden stark denaturierten L.casei L-LDH-Monomeren gegenüber den im Gel vorliegenden Tetrameren bei pH 7,2 : Noch renaturisierbare L.casei L-LDH-Monomere (erhalten nach 15 h Dialyse gegen Dissoziationspuffer) bilden einen Doppelsporn mit den im Test vorliegenden Tetrameren aus, während diese Tetrameren einen einfachen Sporn gegen die irreversibel denaturierten Monomeren richten (Abb. 7, Abb. 8).

Diese Veränderungen der antigenen Eigenschaften der nach 60 h Dialyse im Dissoziationspuffer anfallenden L.curvatus und L.casei L-LDH-Monomeren müssen somit als Ausdruck sehr tiefgreifender Umfaltungen der Enzymproteine interpretiert werden, die eine Reassoziatio n zu aktiven Tetrameren verhindern.

2.2 Immunologische Kreuzreaktionen der L-LDH-asen innerhalb der Familie der Milchsäurebakterien

Zusätzlich zu den Antikörpern gegen die L-LDH-asen von *L.casei* ssp. *casei* ATCC 393 und *L.curvatus* DSM 20010 wurden Antikörper gegen die L-LDH von *L.plantarum* ssp. *plantarum* ATCC 14917 hergestellt.

Mit Hilfe dieser 3 Antiseren wurden die Ähnlichkeitsbeziehungen der L-LDH-asen innerhalb der Familie der Milchsäurebakterien untersucht. Eine Übersicht über den Bereich der Kreuzreaktionen der anti-L-LDH-asen von *L.casei*, *L.curvatus* und *L.plantarum* gibt Tab. 2.

Wie aus ihr zu ersehen ist, treten keine Immunpräzipitate mit den Extrakten von Bakterienstämmen auf, die nur eine D-LDH besitzen. Außerdem ergeben die Extrakte von *L.helveticus*, *L.cellobiosus*, *B.adolescentis*, *B.pseudolongum* sowie von einem Vertreter aus der Familie der Mikrokokken (*M.luteus*) mit keinem der 3 Antiseren positive Reaktionen.

2.2.1 Immunreaktionen mit anti-L.casei L-LDH

Das Ergebnis der Reaktionen im Standard-Immundiffusionstest mit anti-L.*casei* L-LDH zeigt Abb. 9 .

Alle für diese Untersuchungen herangezogenen Stämme von *L.casei* einschließlich *L.zeae* ergaben in allen Fällen die gleichen Immunreaktionen und wurden deshalb unter der Bezeichnung "L.*casei*-Gruppe" zusammengefaßt. Ebenfalls keine immunologische Unterscheidung war zwischen *L.curvatus* und *L.sake*, zwischen *L.salivarius* und *L.confusus*, zwischen *L.acidophilus* und *L.xylosum* sowie zwischen *L.viridescens* ssp. *halotolerans*, *L.viridescens* ssp. *minor* und *Sc.milleri* möglich. Die sich bei allen Kreuzreaktionen gleich verhaltenden Stämme wurden dementsprechend in Abb. 9 jeweils einer Stufe zugeordnet.

Tab. 2: Übersicht über den Bereich der Kreuzreaktion der präparierten Antiseren

Stammbezeichnung	Besitz einer NAD-abhängigen Laktatdehydrogenase			Kreuzreaktion mit anti-L-LDH von		
	L-LDH	D-LDH		L.ca-sei	L.cervatus	L.plan-tarum
<u>Lactobacillus</u>						
Streptobacterium						
L.casei ssp.alactosus ATCC 27216	+	+ 1)		+	+	+
L.casei ssp.casei ATCC 334	+	+ 1)		+	+	+
L.casei ssp.casei ATCC 393	+	+ 1)		+	+	+
L.casei ssp.casei ATCC 27092	+	+ 1)x		+	+	+
L.casei ssp.pseudo-plantarum DSM 20008	+	+ 1)		+	+	+
L.casei ssp.rhammosus ATCC 7469	+	+ 1)		+	+	+
L.casei ssp.tolerans DSM 20012	+	+ 1)		+	+	+
L.coryniformis ssp. coryniformis DSM 20001	-	+ 1)		-	-	-
L.curvatus DSM 20010	+	+ 1)		+	+	+
L.plan-tarum ssp. plantarum ATCC 14917	+	+ 1)		+	+	+
L.sake ATCC 15578	+	+ 1)		+	+	+
L.xylo-sus ATCC 15577	+	- 1)		+	-	+
L.zeeae ATCC 15820	+	+ 1)		+	+	+
Thermobacterium						
L.acidophilus DSM 20243	+	+ 2)		+	+	+
L.helveticus DSM 20075	+	+ 3)x		-	-	-
L.lactis ATCC 12315	-	+ 3)x		-	-	-
L.salivarius ssp. salivarius Rogosa HO 128 X	+	- 3)x		+	+	+
Betabacterium						
L.cellobiosus ATCC 11739	-	+ 3)		-	-	-
L.confusus NCDO 1975	+	+ 4)		+	-	+
L.reuteri DSM 20016	+	+ 5)		-	-	+
L.viridescens DSM 20248	+	+ 4)x		-	-	-
L.viridescens ssp. halotolerans DSM 20190		n.b.		+	-	+
L.viridescens ssp. minor DSM 20014		n.b.		+	+	+
<u>Streptococcus</u>						
Sc.faecalis DSM 20376	+	- 6)x		+	+	+
Sc.faecium DSM 20382		n.b.		+	+	+
Sc.milleri DSM 20061		n.b.		+	-	-
<u>Pediococcus</u>						
P.cerevisiae DSM 20291	+	+ 7)		+	+	+
<u>Leuconostoc</u>						
Lc.mesenteroides DSM 20071	-	+ 8)x		-	-	-
<u>Bifidobacterium</u>						
B.lactiscentis ATCC 15703	+	- 9)		-	-	-
B.pseudolongum ATCC 25526	+	- 9)		-	-	-
<u>Microbacterium</u>						
M.luteus ATCC 4698		n.b.		-	-	-

1) Stetter, 1973;

2) Helming, 1976;

3) Gasser, 1970;

4) Sharpe et al., 1972;

8) Garvie, 1969;

9) Lauer, 1974;

5) Kandler und Stetter, 1973;

6) Wittenberger und Angelo, 1970;

7) Back, 1974;

x Der Besitz einer NAD-abhängigen D- bzw. L-LDH ist nur nachgewiesen für die entsprechende Art bzw. Unterart, nicht jedoch für den hier verwendeten Stamm.

L. casei-Gruppe

↑										L. curvatus, L. sake
↑	×									L. plantarum
↑	↑	↑								P. cerevisiae
↑	↑	↑	=							Sc. faecalis
↑	↑	↑	↑	×						L. acidophilus, L. xylosum
↑	↑	↑	↑	=	↑	=				L. salivarius, L. confusus
↑	↑	↑	↑	=	↑	=	×	↑		Sc. faecium
↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	L. viridescens ssp. minor, L. viridescens ssp. halotolerans
										Sc. milleri

Abb. 9: Ergebnis der immunologischen Kreuzreaktionen der L-LDH-Asen verschiedener Milchsäurebakterien im Standard-Immendiffusionstest mit anti-L. casei L-LDH

Das Auftreten eines Doppelsporns zwischen *L. curvatus* (*L. sake*) und *L. plantarum* bedeutet, daß die im Standard-Immendiffusionstest vorliegenden L-LDH-Formen von *L. curvatus* (bzw. von *L. sake*) und *L. plantarum* verschiedene antigene Determinanten mit dem homologen Antigen der *L. casei* L-LDH gemeinsam haben. Da der Immunttest in diesem Fall unter Bedingungen (0,04 M Phosphat-Puffer pH 7,1) durchgeführt wurde, die eine Dissoziation der

L. curvatus L-LDH bewirken, wäre es denkbar, daß die Immunreaktion der Nichtidentität zwischen den L-LDH-asen von *L. curvatus* und *L. plantarum* auf den unterschiedlichen Quartärstrukturzustand dieser L-LDH-asen zurückzuführen ist. Zur Klärung dieser Frage wurde der Versuch unter Verwendung von Imidazol-Puffer bei pH 7,2 in Gegenwart der Effektoren Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 , die den tetrameren Zustand der *L. curvatus* L-LDH stabilisieren, wiederholt. Als Kontrolle wurde als Gelpuffer ebenfalls Imidazol-Puffer, jedoch ohne Effektorenzusatz verwendet.

Während sich bei pH 7,2 ohne Effektoren die gleichen Immunreaktionen wie im Standard-Immundiffusionstest ergaben, trat in Gegenwart der Effektoren anstelle des Doppelsporns ein einfacher Sporn von *L. curvatus* und *L. sake* gegen *L. plantarum* auf.

Daraus kann man schließen, daß die *L. curvatus* L-LDH-Tetrameren mehr antigene Determinanten mit dem homologen Antigen der *L. casei* L-LDH gemeinsam haben (Abb. 9) als die L-LDH von *L. plantarum*.

Das gleiche Verhalten von *L. curvatus* und *L. sake* bedeutet wohl, daß die L-LDH von *L. sake* ebenso wie die von *L. curvatus* bei neutralem pH-Wert dissoziiert, und daß diese Dissoziation ähnlich wie im Fall der *L. curvatus* L-LDH durch die Anwesenheit der Effektoren verhindert werden kann.

Die Ausbildung eines einfachen Sporns von *Sc. faecalis* gegen *Sc. faecium* und von *P. cerevisiae* gegen *L. acidophilus* (bzw. gegen *L. xylosus*) einerseits und das Auftreten eines Doppelsporns sowohl zwischen *L. acidophilus* (bzw. *L. xylosus*) und *Sc. faecalis* als auch zwischen *L. acidophilus* (bzw. *L. xylosus*) und *Sc. faecium* andererseits deuten auf die Existenz zweier Entwicklungslinien der entsprechenden L-LDH-asen hin, nämlich auf die der L-LDH-asen von *Sc. faecalis*--*Sc. faecium* und auf die der L-LDH-asen von *P. cerevisiae*--*L. acidophilus* (bzw. *L. xylosus*).

In diesem Zusammenhang gibt es keinen Hinweis dafür, daß das Auftreten eines Doppelsporns von *Sc. faecalis* (bzw. *Sc. faecium*) und *L. acidophilus* (bzw. *L. xylosus*) auf das Vorliegen verschiedener Quartärstrukturzustände der entsprechenden L-LDH-asen zurückzuführen ist.

Die Ausbildung konfluenter Präzipitationszonen der Extrakte von *P.cerevisiae* und *Sc.faecalis* kann nicht als Ausdruck immunologischer Identität gewertet werden, da sich ja die beiden L-LDH-assen gegenüber der L-LDH von *L.acidophilus* (bzw. von *L.xylosus*) unterschiedlich verhalten: Die L-LDH von *P.cerevisiae* richtet einen einfachen Sporn gegen die L-LDH von *L.acidophilus* (bzw. von *L.xylosus*), während die L-LDH von *Sc.faecalis* mit letzterer einen Doppelsporn ausbildet. Wahrscheinlich ist die entsprechende Immunreaktion der Nichtidentität (Doppelsporn) oder die der partiellen Identität (einfacher Sporn) zwischen den L-LDH-assen von *P.cerevisiae* und *Sc.faecalis* zu schwach, als daß sie hätte erkannt werden können.

Da die L-LDH von *P.cerevisiae* nur einen einfachen, wenn auch relativ schwachen Sporn gegen die L-LDH von *Sc.faecium* richtet, wäre es denkbar, daß die Linie *Sc.faecalis*--*Sc.faecium* von der Linie *P.cerevisiae*--*L.acidophilus* (bzw. *L.xylosus*) bei *P.cerevisiae* abzweigt.

Die Position der L-LDH von *L.salivarius* (bzw. *L.confusus*) in diesem System abnehmender Ähnlichkeit vom homologen Antigen ist unsicher. Zwar ergeben die Extrakte von *L.salivarius* (bzw. von *L.confusus*) konfluente Präzipitationszonen mit denen von *L.acidophilus* (bzw. von *L.xylosus*), doch sind im Fall von *L.salivarius* (bzw. *L.confusus*) keine Doppelsporne mit den L-LDH-assen von *Sc.faecalis* und *Sc.faecium* zu erkennen, wie sie für die L-LDH von *L.acidophilus* (bzw. von *L.xylosus*) charakteristisch sind: Die L-LDH von *Sc.faecalis* spornt gegen die von *L.salivarius* (bzw. von *L.confusus*) und letztere gegen die von *Sc.faecium*. Die L-LDH-assen von *L.salivarius* (bzw. von *L.confusus*) und von *L.acidophilus* (bzw. von *L.xylosus*) können somit nicht immunologisch gleichwertig sein.

Aufgrund der hier zur Verfügung stehenden Daten kann nur festgestellt werden, daß die L-LDH von *L.salivarius* (bzw. von *L.confusus*) vergleichbar viele, jedoch nicht die gleichen antigenen Determinanten wie die L-LDH von *L.acidophilus* (bzw. von *L.xylosus*) mit der L-LDH von *L.casei* gemeinsam hat.

Die L-LDH-asen von *L.viridescens* ssp. *minor*, *L.viridescens* ssp. *halotolerans* und *Sc.milleri* haben unter den Stämmen, deren L-LDH-asen positive Reaktionen zeigen, die wenigsten antigenen Determinanten mit dem homologen Antigen gemeinsam (Abb. 12). Gegen diese L-LDH-asen richten alle anderen L-LDH-asen mehr oder weniger deutliche Sporne.

Keine Immunreaktion konnte mit *L.reuteri* festgestellt werden.

2.2.2 Immunreaktionen mit anti-*L.curvatus* L-LDH

Die entsprechenden Tests mit anti-*L.curvatus* L-LDH erlauben eine weniger differenzierte Aufgliederung (Abb. 10). So können hier nur die L-LDH-asen von 5 Organismen-Gruppen immunologisch voneinander unterschieden werden.

L.curvatus und *L.sake* verhalten sich auch hier identisch, ebenso die einzelnen Unterarten von *L.casei* einschließlich *L.zeae*.

Die L-LDH von *L.acidophilus* einerseits und die L-LDH-asen von *L.salivarius*, *Sc.faecalis*, *Sc.faecium* und *P.cerevisiae* andererseits lassen sich nur durch die Intensität des Sporns gegen die L-LDH-asen von *L.viridescens* ssp. *minor* und *L.plantarum* voneinander unterscheiden (Abb. 10).

Die Ergebnisse der Kreuzreaktionen sprechen für eine Abnahme der Ähnlichkeit der untersuchten L-LDH-asen vom homologen Antigen in der Reihe, wie sie in Abb. 12 dargestellt ist. In dieser Abbildung sind die Immunreaktionen der L-LDH-Tetrameren von *L.curvatus* und *L.sake* berücksichtigt, wie sie im Immundiffusionstest in Gegenwart von Mn^{2+} und Fru-1,6-P₂ bei pH 7,2 (Imidazol-Puffer) erhalten wurden.

Zusätzlich zu der L-LDH von *L.reuteri*, die auch im Test mit anti-*L.casei* L-LDH keine positive Reaktion zeigte, konnte ebenfalls für die L-LDH von *L.xylosus*, *L.viridescens* ssp. *halotolerans*, *L.confusus* und *Sc.milleri* keine positive Reaktion nachgewiesen werden.

L. curvatus, *L. sake*

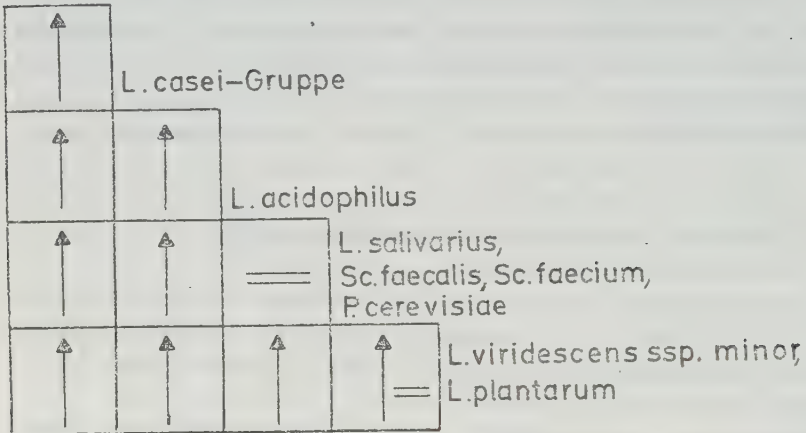


Abb. 10:

Ergebnis der immunologischen Kreuzreaktionen der L-LDH-asen verschiedener Milchsäurebakterien im Standard-Immudiffusionstest mit anti-*L. curvatus* L-LDH

2.2.3 Immunreaktionen mit anti-*L. plantarum* L-LDH

Die Ergebnisse der Kreuzreaktionen mit dem Antiserum gegen die *L. plantarum* L-LDH sind in Abb. 11 dargestellt.

Bei allen Reaktionen im Standard-Immudiffusionstest (Phosphat-Puffer pH 7,1) können ebensowenig Unterschiede zwischen den L-LDH-asen von *L. salivarius* und *L. reuteri* wie zwischen den L-LDH-asen aller Unterarten von *L. casei* unter Einschluß von *L. zeae* erkannt werden. Ferner verhalten sich die drei L-LDH-asen von *Sc. faecalis*, *Sc. faecium*, *L. viridescens* ssp. *minor* und die vier L-LDH-asen von *L. curvatus*, *L. sake*, *L. xylosus* und *L. confusus* jeweils untereinander identisch (Abb. 11).

In der letzteren Gruppe ergibt sich insofern eine Differenzierung, als sich die L-LDH-asen von *L. curvatus* und *L. sake* unter den Bedingungen, die den tetrameren Zustand stabilisieren (Imidazol-

Puffer pH 7,2 bei Anwesenheit der Effektoren), immunologisch deutlich von den L-LDH-Asen von *L.xylosus* und *L.confusus* unterscheiden: Die L-LDH-Tetrameren von *L.curvatus* und *L.sake* spornen in Anwesenheit der Effektoren gegen die L-LDH-Asen von *Sc.faecalis*, *Sc.faecium* und von *L.viridescens ssp. minor*.

Im tetrameren Zustand besitzen die L-LDH-Asen von *L.curvatus* und *L.sake* somit mehr Ähnlichkeit mit der L-LDH von *L.plantarum* als im monomeren Zustand, wie er unter den Bedingungen des Standard-Immundiffusionstests (Phosphat-Puffer pH 7,1) oder im modifizierten Immundiffusionstest (Imidazol-Puffer pH 7,2 ohne Effektoren) dominiert.

Da auch bei pH 7,2 mit Effektoren die L-LDH von *L.viridescens ssp. halotolerans* gegen die L-LDH-Asen von *L.curvatus* und *L.sake* spornen, müssen die L-LDH-Tetrameren von *L.curvatus* und *L.sake* aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem homologen Antigen zwischen den L-LDH-Asen von *L.viridescens ssp. halotolerans* und denen von *Sc.faecalis*, *Sc.faecium* und *L.viridescens ssp. minor* angeordnet werden (Abb. 12).

Die in Abb. 11 gekennzeichnete Kreuzreaktionen mit konfluenten Präzipitationszonen können auch hier nicht als Ausdruck immunologischer Identität interpretiert werden. So muß die L-LDH von *L.acidophilus* trotz konfluenter Präzipitationszonen mit den L-LDH-Asen von *L.salivarius* und *L.reuteri* mehr antigene Determinanten mit dem homologen Antigen gemeinsam haben als die L-LDH-Asen von *L.salivarius* und *L.reuteri*, da sie deutliche Sporne gegen die L-LDH-Asen von *L.casei*, *P.cerevisiae* und *L.viridescens ssp. halotolerans* richtet, die L-LDH-Asen von *L.salivarius* und *L.reuteri* jedoch mit denen der letztgenannten Stämme nur konfluente Präzipitationszonen ausbilden.

Aus ähnlichem Grund müssen die L-LDH-Asen der *L.casei*-Gruppe denen der Laktobazillen *L.salivarius* und *L.reuteri* nachgeordnet werden, da die L-LDH von *acidophilus* sich nicht erkennbar in ihrer Immunreaktion von den L-LDH-Asen von *L.salivarius* und *L.reuteri* unterscheidet, jedoch einen deutlichen Sporn gegen die L-LDH-Asen der *L.casei*-Gruppe richtet.

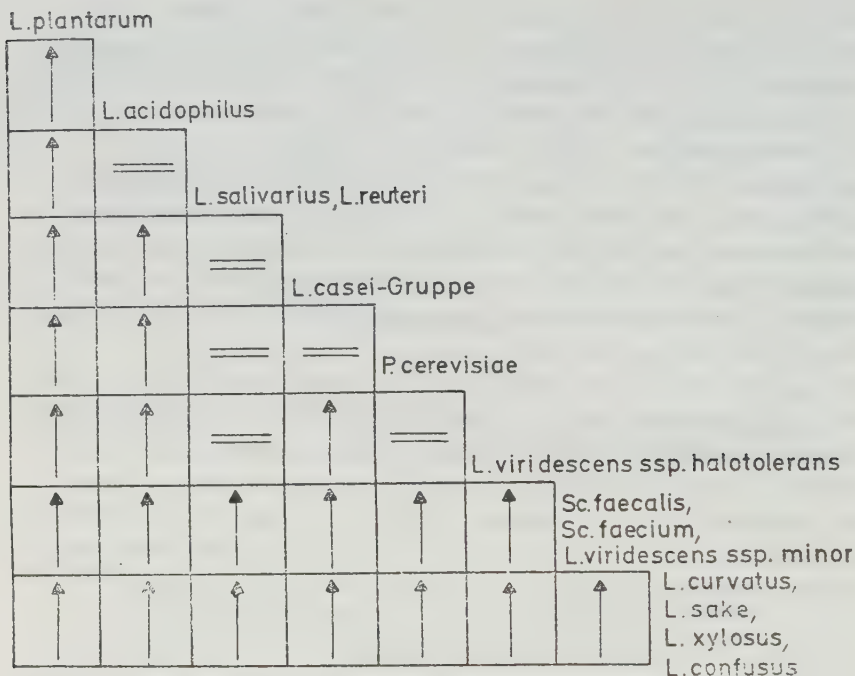


Abb. 11: Ergebnis der immunologischen Kreuzreaktionen der L-LDH-asen verschiedener Milchsäurebakterien im Standard-Immendiffusionstest mit anti-L. plantarum L-LDH

Die L-LDH-asen von *P. cerevisiae* und *L. viridescens ssp. halotolerans* wie die der *L. casei*-Gruppe lassen sich nur schwer differenzieren. Allein die Spornbildung der L-LDH-asen der *L. casei*-Gruppe gegen die von *L. viridescens ssp. halotolerans* zeigt, daß die *L. casei*-Gruppe in bezug auf die L-LDH *L. plantarum* näher steht.

Die L-LDH von *P. cerevisiae* nimmt dagegen eine gewisse Zwischenstellung ein; sie bildet sowohl mit den L-LDH-asen der *L. casei*-Gruppe als auch mit der von *L. viridescens ssp. halotolerans* konfluente Präzipitationszonen aus.

Entsprechend den Ergebnissen der Immuntests mit anti-*L. curvatus* L-LDH, jedoch abweichend von denen mit anti-*L. casei* L-LDH ergibt der Extrakt von *Sc. milleri* keine positive Reaktion mit den Antikörpern gegen die *L. plantarum* L-LDH.

3. Diskussion

3.1 Quartärstruktur und immunologisches Verhalten der L-LDH von L.curvatus und L.casei

3.1.1 Vergleich der Ergebnisse aus immunologischen Untersuchungen, Sedimentationsanalysen und Hybridisierungsversuchen

Wie die Immundiffusionsexperimente zeigen, unterscheidet sich sowohl bei L.casei als auch bei L.curvatus die monomere von der tetrameren L-LDH in ihrer Antigenität. Die Immunreaktionen zeigen eine ähnliche Abhängigkeit vom pH-Wert und der Anwesenheit der Effektoren Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 , wie sie auch bei den Untersuchungen der reversiblen Dissoziation der L-LDH-asen durch Sedimentationsanalysen und Hybridisierungsstudien (Mayr, 1977) beobachtet wurde.

Insgesamt bestätigen sie die Grundbeobachtung: Schwach saure pH-Werte begünstigen den tetrameren Zustand, neutrale bis schwach basische pH-Werte fördern die Dissoziation der L-LDH-asen. Dementsprechend dissoziieren die L-LDH-Tetrameren im Gel bei pH 8,8 zu Monomeren, während renaturierungsfähige Monomere bei pH 5,5 - für die L.curvatus L-LDH ist zusätzlich die Anwesenheit der Effektoren nötig - wieder Tetramere bilden, die in ihrer Immunreaktion von den nativen Tetrameren nicht zu unterscheiden sind. Außerdem fällt im Immuntest wieder die größere pH-Stabilität der L.casei L-LDH-Tetrameren im Vergleich zu denen von L.curvatus auf. Die L.casei L-LDH-Tetrameren bleiben bei pH 7,2 auch ohne Effektoren - im Gegensatz zu denen von L.curvatus, die unter diesen Bedingungen bereits dissoziieren - als solche erhalten und reagieren in diesem Zustand mit den Antikörpern.

Darüberhinaus zeigen die immunologischen Tests, daß die Effektoren zwar die Quartärstruktur der L.curvatus L-LDH beeinflussen können, nicht aber die der L.casei L-LDH.

So sind sie im Fall der L.curvatus L-LDH der ausschlaggebende

Faktor sowohl für die Aufrechterhaltung des tetrameren Zustandes bei pH 5,5 und pH 7,2 als auch für die Aggregation von renaturierungsfähigen Monomeren zu Tetrameren bei pH 5,5, während sie bei der L.casei L-LDH unter den Bedingungen des Immundiffusionstests keinen erkennbaren Einfluß auf die Stabilisierung bzw. Wiederherstellung des tetrameren Zustandes haben. Nur eine höhere Protonenkonzentration (pH 5,5) vermag die dissoziierten, noch renaturisierbaren Monomeren der L.casei L-LDH zu reaggregieren.

Die Wirkung der Effektoren beschränkt sich bei der L.casei L-LDH offensichtlich nur auf eine im Immundiffusionstest nicht erfaßbare Konformationsänderung innerhalb des bereits vorliegenden Tetramers, die für die höhere Substrataffinität und für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität in einem verbreiterten pH-Bereich verantwortlich sein dürfte (Mayr, 1977).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Sedimentationsanalysen von Mayr (1977), die bei pH 5,5 ohne Effektoren für die Existenz stabiler L.curvatus L-LDH-Tetramerer sprechen ($s_{20,w} = 6,9S$), steht die Beobachtung, daß im Immundiffusionstest bei pH 5,5 ohne Effektoren die L.curvatus L-LDH dissoziiert.

Es wäre möglich, daß die Zugabe der Enzymlösung (pH 6,5) in nächster Nähe des Auftragsortes eine geringfügige pH-Erhöhung des Gels bewirkt, so daß eine leichte Verschiebung des Oligomergleichgewichtes zugunsten der Monomeren eintritt. Im Verlauf der Diffusion könnten sich dann die schneller diffundierenden Monomeren durch die zunehmende Verdünnung an der Diffusionsfront dem Monomer-Tetramer-Gleichgewicht entziehen, so daß die Diffusionsfront überwiegend aus Monomeren besteht. Zur Reaktion mit den Antikörpern kommen dann schließlich nur noch diese.

Es wäre grundsätzlich denkbar, daß die hier beschriebenen Unterschiede in den Immunreaktionen nicht nur auf eine durch pH-Wert und Effektoren bedingte Beeinflussung der Struktur der Antigene sondern auch auf eine Veränderung der Antikörper zurückzuführen ist.

Eine derartige Beeinflussung der Antikörper scheint aber in diesem Fall aus mehreren Gründen unwahrscheinlich.

Da für die Immunpräzipitation hauptsächlich elektrostatische Bindungskräfte zwischen Antigen und Antikörper verantwortlich sind, sollte man zwar bei drastischer Änderung des pH-Wertes und der Ionenstärke eine Beeinträchtigung der Reaktionsspezifität erwarten, die in diese Tests eingesetzten Ionenkonzentrationen von Mn^{2+} und Fru-1,6-P₂ (je 2 mM) fallen aber bei einer 0,15 M NaCl-Basiskonzentration im Agarose-Gel kaum ins Gewicht. Zudem spricht die nicht durch Mg^{2+} -Ionen ersetzbare Wirkung der Mn^{2+} -Ionen auf das immunologische Verhalten der L.curvatus L-LDH deutlich für die L-LDH als alleinigem Angriffspunkt der Effektoren.

Ein direkter Hinweis darauf, daß der pH-Wert und die Effektoren nur die jeweilige Antigenstruktur spezifisch beeinflussen, muß auch in der unterschiedlichen Wirkung dieser Faktoren auf die Immunpräzipitation der L.casei und L.curvatus L-LDH gesehen werden:

Bei pH 7,2 ist die Anwesenheit der Effektoren im Immundiffusionsansatz unbedingt nötig, um die typische Tetramerenreaktion für die im nativen Zustand eingesetzte L.curvatus L-LDH zu gewährleisten, während im Fall der L.casei L-LDH die Effektoren ohne Wirkung auf die Immunreaktion bleiben und die typische Tetramerenreaktion nur durch Erhöhung der Protonenkonzentration (pH 5,5) induziert werden kann.

Würden aber vornehmlich die Antikörper durch Mn^{2+} und Fru-1,6-P₂ sowie durch die veränderte Protonenkonzentration beeinflusst, dürfte man keine derartige Differenzierung feststellen.

3.1.2 Interpretation der unterschiedlichen Antigenität von monomerer und tetramerer L-LDH

Der Einfluß der Dissoziation oligomerer Enzyme auf die Antigenität wurde schon in mehreren Fällen untersucht. Die meisten bisher beschriebenen, zum Teil sehr drastischen Dissoziationsbedingungen führen jedoch auch zu Veränderungen der Tertiärstruktur, die nicht in unmittelbarer Verbindung mit der Dissoziation stehen

und damit auch nicht als direktes Ergebnis der Quartärstruktur-änderung gewertet werden können.

Beispielsweise wurde die Aspartattranscarbamylase von *E.coli* mit p-HMB chemisch modifiziert und irreversibel in ihre katalytischen und regulativen Untereinheiten gespalten (Bethell et al., 1968). Die Bildung eines Sporns von chemisch modifizierten katalytischen Untereinheiten gegen das native Enzym bei der Immundiffusion mit Antiserum gegen die modifizierten katalytischen Untereinheiten führen die Autoren auf eine assoziationsbedingte Veränderung bzw. Maskierung eines Teils der antigenen Determinanten der Untereinheiten zurück. Es ist in diesem Fall aber auch möglich, daß die antigenen Determinanten der katalytischen Untereinheiten zusätzlich durch p-HMB verändert werden, so daß nicht sicher entschieden werden kann, ob die Veränderung der Antigenität primär auf den veränderten Aggregationszustand oder auf die chemische Modifikation des Enzyms zurückgeht.

Wesentliche Veränderungen der Tertiärstruktur, die nicht in unmittelbarer Verbindung mit der Dissoziation stehen, treten wohl bei jeder nicht reversiblen Dissoziation oligomerer Proteine auf, unabhängig davon, ob diese durch chemische Modifikation oder durch pH-Änderung induziert wird. In diesen Fällen ist es schwierig, die allein durch den Aggregationszustand bedingten Änderungen der Oberflächenstruktur von zusätzlichen Veränderungen der Tertiärstruktur der dissoziierten Untereinheiten zu unterscheiden.

Ein Beispiel dafür ist auch die alkalische Phosphatase von *Bacillus licheniformis*, die sich durch Inkubation mit 0,01 M HCl (pH 2,9) zwar in ihre Untereinheiten zerlegen, aber nicht mehr renaturieren läßt (Hulett-Cowling und Campbell, 1971).

Die von den Autoren gefundene geringe Ähnlichkeit zwischen der antigenen Struktur der denaturierten Untereinheiten und der des nativen Enzyms kann sicherlich nicht nur als unmittelbare Folge der Dissoziation, sondern als Ergebnis aller Umfaltungen gewertet werden, die im engeren und weiteren Zusammenhang mit der Oligomerendissoziation stattfinden.

Bei reversibel dissoziierbaren Enzymsystemen kann das Ausmaß der Strukturänderung durch die Oligomerendissoziation auch an der Reaktivierungsdauer abgelesen werden: Lange Reaktivierungszeiten sprechen für weitgehende, kurze für eher geringfügige Umlagerungen der Tertiärstruktur.

So deutet schon die Tatsache, daß die dissoziierte alkalische Phosphatase von *E.coli* erst nach 18 h maximal reaktiviert werden kann (Schlesinger, 1965) auf sehr weitreichende Umfaltungen der Untereinheiten hin. Erwartungsgemäß ergeben die Untereinheiten im Immundiffusionstest mit Antiserum gegen das native Enzym kein sichtbares Präzipitat. Auch das Ergebnis der Untersuchungen von Lazdunski et al. (1975) über die Veränderung der antigenen Eigenschaften dieses Enzyms während der Dissoziation bzw. Reassoziaton spricht für sehr komplexe Strukturveränderungen im Zusammenhang mit der Dissoziation.

Dagegen lassen die extrem kurzen Halbwertszeiten der Renaturierung von 17 s für die *L.curvatus* L-LDH und von 2,3 min für die *L.casei* L-LDH (Mayr, 1977) nach 15 h Dissoziation bei pH 7,8 (*L.curvatus*) bzw. pH 8,8 (*L.casei*) den Schluß zu, daß unter diesen milden Dissoziationsbedingungen weniger sekundäre Tertiärstrukturänderungen induziert werden. Außerdem zeigen die in ihrer Stärke vergleichbaren Immunpräzipitate von dissoziierten und nativen L-LDH-Formen eine auch nach der Dissoziation weitgehend erhaltene Oberflächenstruktur an.

Die beobachtbaren Unterschiede in der antigenen Struktur zwischen den L-LDH-Mono- und Tetrameren können daher als Ausdruck primärer Veränderungen der Proteinoberfläche bei den Assoziations- bzw. Dissoziationsvorgängen gewertet werden und müssen auf kleinere, infolge pH-Verschiebung bzw. Effektorenzusatz induzierte Konformationsänderungen, hauptsächlich jedoch auf das Freilegen bzw. Verdecken spezieller Untereinheiten-Bindungsstellen zurückgeführt werden.

Drastische Dissoziationsbedingungen, wie eine auf 60 h verlängerte Dialyse gegen alkalischen Puffer, ergeben sowohl bei der *L.casei*

als auch bei der *L.curvatus* L-LDH offensichtlich stärker umgefaltete Monomere; denn wie die dissoziierte alkalische Phosphatase von *Bacillus licheniformis* sind auch die L-LDH-Formen nicht mehr reaktivierbar und zeigen dementsprechend deutlich weniger Ähnlichkeit mit dem homologen Antigen als die noch renaturierbaren L-LDH-Monomeren. Die Befunde weisen darauf hin, daß sich an die eigentliche Dissoziation der Oligomeren noch weitere Veränderungen der Tertiärstruktur anschließen.

Ähnliche Effekte ergeben sich auch nach verschieden langer Harnstoffdenaturierung der L-LDH von *L.curvatus* (Mayr, 1977). Der Anteil der langsamer renaturierenden und damit stärker entfaltenen Monomeren nimmt auch hier mit längerer Denaturierungsdauer zu.

3.2 Immunologischer Vergleich der L-LDH-asen verschiedener Milchsäurebakterien

3.2.1 Berücksichtigung von Dissoziationseffekten der Antigene

Wie am Beispiel der L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus* gezeigt werden konnte, führen auch Veränderungen der Quartärstruktur zu unterschiedlichen Reaktionen der Antigene im Immundiffusionstest. Dies hat zur Folge, daß es zu falschen Aussagen über die Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den entsprechenden Antigenen kommen muß, wenn diese im Immundiffusionstest in verschiedenen Quartärstrukturzuständen einander gegenüber gestellt werden.

Da die *L.curvatus* L-LDH - und mit großer Wahrscheinlichkeit auch die *L.sake* L-LDH - im Standard-Immundiffusionstest in Monomere dissoziiert, kann sie folglich nicht mit L-LDH-asen verglichen werden, die unter diesen Bedingungen als Tetramere vorliegen. Die leichte Dissozierbarkeit der L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.sake* scheint jedoch ein Ausnahmefall innerhalb der L-LDH-asen der Milchsäurebakterien darzustellen. Jedenfalls zeigt das elektrophoretische Verhalten (Polyacrylamid-Gel bei pH 7,5) aller bislang

untersuchten L-LDH-asen von Milchsäurebakterien, daß die ausgeprägte pH-Dissoziierbarkeit der *L.curvatus* L-LDH, die in diesem Elektrophoresesystem für die auffallend weite Wanderungsstrecke verantwortlich gemacht werden muß (Mayr, 1977) nur noch bei der L-LDH von *L.sake* zu finden ist (Kandler und Stetter, 1973). Alle anderen L-LDH-asen mit ihrer deutlich geringeren elektrophoretischen Beweglichkeit weisen wohl unter diesen pH-Bedingungen einen stabilen tetrameren Zustand auf und dürften demnach auch in dem bei ähnlichem pH-Wert ausgeführten Standard-Immundiffusionstest als Tetramere mit den Antikörpern reagieren.

Um auch die im Verlauf der Phylogenie aufgetretenen Veränderungen der L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.sake* im Vergleich zu den übrigen L-LDH-asen ohne Verfälschung durch Dissoziationseffekte erfassen zu können, wurden diese beiden L-LDH-asen im Immundiffusionstest durch Zugabe der Effektoren Mn^{2+} und Fru-1,6-P₂ im tetrameren Zustand stabilisiert.

3.2.2 Immunologische Beziehung zwischen regulierbaren und nicht regulierbaren L-LDH-asen

Die enge Beziehung zwischen den allosterischen L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus*, wie sie sich in der Ähnlichkeit der katalytischen Eigenschaften und in der Fähigkeit aktive Hybridenzyme zu bilden (Mayr, 1977) ausdrückt, wird auch in den vergleichenden immunologischen Tests bestätigt: Die L-LDH von *L.curvatus* zeigt - neben der L-LDH von *L.sake* - in ihren Immunreaktionen sehr große Ähnlichkeit mit den L-LDH-asen der *L.casei*-Gruppe (Abb. 12).

Allerdings überrascht die geringe Ähnlichkeit der ebenfalls durch Mn^{2+} und Fru-1,6-P₂ regulierbaren L-LDH von *L.xylosus* mit den Enzymen von *L.curvatus*, *L.sake* und *L.casei*. Diese geringe immunologische Beziehung kommt am deutlichsten in den Immuntests unter Verwendung von anti-*L.curvatus* L-LDH zum Ausdruck, in denen keine positive Reaktion mit den Extrakten von *L.xylosus* festgestellt werden konnte.

Andererseits lassen sich aus den Reaktionen der nicht regulierbaren L-LDH von *L.plantarum* - speziell unter Verwendung von anti-L.casei L-LDH - enge Ähnlichkeitsbeziehungen zur allosterisch regulierbaren L.casei L-LDH erkennen (Abb. 12).

Die Verschiedenartigkeit der antigenen Strukturen innerhalb der durch Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 regulierbaren L-LDH-asen ist demnach zu groß, als daß sich mit immunologischen Methoden eine engere phylogenetische Zusammengehörigkeit dieser Gruppe nachweisen ließe. Somit kann auch nicht entschieden werden, ob sich alle durch Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 regulierbaren L-LDH-asen von einem allosterisch regulierbaren L-LDH-Vorfahren ableiten lassen oder ob diese allosterische Regulierbarkeit mehrmals entwickelt wurde.

Eine bevorzugte Ähnlichkeit zwischen den durch Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 regulierbaren und den nur durch Fru-1,6- P_2 regulierbaren L-LDH-asen läßt sich ebenfalls nicht erkennen: Zwar zeigt die durch Fru-1,6- P_2 regulierbare L-LDH von *Sc.faecalis* bei Verwendung von anti-L.casei L-LDH eine deutliche Ähnlichkeit mit der L.casei L-LDH, doch ist diese nicht größer als die der nicht regulierbaren L-LDH von *P.cerevisiae* zur L.casei L-LDH (Abb. 9).

3.2.3 Die Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den L-LDH-asen der Milchsäurebakterien als Ausdruck phylogentischer Beziehungen

Im Gegensatz zu den Befunden von Gordon und Doelle (1976), die bei ihren immunologischen Studien ebenfalls ein gegen die L-LDH von *L.casei* ssp. *casei* ATCC 393 gerichtetes Antiserum verwendeten, konnten bei unseren Untersuchungen auch immunologische Reaktionen mit den L-LDH-asen einiger Thermo- und Betabakterien beobachtet werden. Selbst mit den Extrakten der Strepto- und Pediokokken wurden Immunpräzipitate erhalten.

Die geringe Reaktionsbreite des von Gordon und Doelle verwendeten Antiserums ist wohl auf einen zu niedrigen Antikörpertiter zurückzuführen.

Die eigenen Befunde sprechen jedenfalls ebenso wie die an LDH-asen

von Thermobakterien-, Betabakterien- und Leuconostocstämmen durchgeführten immunologischen Studien von Gasser und Gasser (1971) dafür, daß sich die Immundeterminanten der L-LDH im Verlauf der Evolution der Milchsäurebakterien in weiten Bereichen nur sehr langsam verändert haben.

Die L-LDH-Asen der Streptobakterien zeigen mit Ausnahme der L-LDH von *L.xylosus* untereinander relativ enge immunologische Beziehungen. Die aus diesen Versuchen ableitbare Abseitsstellung von *L.xylosus* innerhalb der Untergattung *Streptobacterium* wird durch die immunologischen Studien von London und Chace (1976) gestützt, die mit Antisera gegen die Aldolase von *P.cerevisiae* und *Sc.faecalis* durchgeführt wurden: Auch in bezug auf die Aldolase weist *L.xylosus* nur geringe Ähnlichkeiten mit *L.casei* auf. Ferner bestätigt die Tatsache, daß *L.xylosus* als einziges *Streptobacterium* keine D-LDH-Aktivität besitzt (Kandler und Stetter, 1973) und zudem einen auffallend geringen GC-Gehalt der DNS (34,9 %; Zuzuki und Kitahara, 1972) aufweist, die Randstellung von *L.xylosus* innerhalb dieser Untergattung.

Innerhalb der Streptobakterien fallen deutlich zwei Organismengruppen auf, deren L-LDH-Asen sich in allen Immuntests identisch verhalten. Es sind dies *L.curvatus* und *L.sake* einerseits und alle Stämme der verschiedenen Subspecies von *L.casei* einschließlich *L.zeae* andererseits.

Die immunologische Identität der L-LDH-Asen von *L.curvatus* und *L.sake* stimmt sowohl mit der gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit als auch mit der gleichartigen allosterischen Regulierbarkeit dieser Enzyme durch Mn^{2+} und Fru-1,6-P₂ überein. Der immunologische Befund bestätigt zudem die enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen diesen beiden Streptobakterien, wie sie sich durch weitere biochemische Merkmale belegen läßt: So besitzen beide Organismen neben einer D-LDH gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit auch eine Laktatracemase (Stetter, 1973) sowie einen sehr ähnlichen GC-Gehalt der DNS (*L.curvatus*: 43,9 %; *L.sake*: 42,2 %; Kandler und Stetter, 1973). Zudem ergaben DNS-DNS-Hybridisierungsversuche einen relativ hohen Homologiegrad von 47 % (Dellaglio et al., 1975).

Die Beobachtung, daß sich die L-LDH-asen der Unterarten von *L.casei* in allen Immundiffusionstests nicht voneinander unterscheiden, spricht für eine engere phylogentische Zusammengehörigkeit dieser Gruppe. Sie bestätigt damit die bereits bestehende Zuordnung dieser Laktobazillen zur gleichen Art trotz der Uneinheitlichkeit in einigen Merkmalen: So lassen sich deutliche Unterschiede in den elektrophoretischen Eigenschaften der D-LDH-asen (Stetter, 1973) sowie in den immunologischen Eigenschaften der induzierbaren Malatenzyme der verschiedenen Subspecies erkennen (London et al., 1971 a, b); ebenso bestätigen DNS-DNS-Hybridisierungsstudien diese Heterogenität (Dellaglio et al., 1975): Der Typstamm *L.casei* ssp. *casei* ATCC 393 und die Unterart *L.casei* ssp. *rhamnosus* weisen nur einen relativ geringen Homologiegrad (30 - 50 %) mit den übrigen Subspecies auf.

Über die verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den Strepto-, Thermo- und Betabakterien in bezug auf die L-LDH kann aufgrund unserer Untersuchungen nur festgestellt werden, daß unter den 3 Streptobakterien allein *L.plantarum* engere phylogentische Beziehungen zu einzelnen Vertretern der Thermo- und Betabakterien - speziell zu *L.acidophilus*, *L.salivarius* und *L.reuteri* - aufweist. Die immunologische Ähnlichkeit der L-LDH von *L.curvatus* und *L.casei* mit denen der Thermo- und Betabakterien ist relativ gering. Allenfalls die immunologischen Reaktionen der L-LDH von *L.acidophilus* lassen eine engere Beziehung zu *L.curvatus* (bzw. *L.sake*) und *L.casei* erkennen.

Bemerkenswerterweise ergeben die durch Fru-1,6-P₂ regulierbaren L-LDH-asen zweier Vertreter der von Orla Jensen (1924) in der 4. Gattung der stäbchenförmigen Milchsäurebakterien zusammengefaßten Bifidobakterien keine positive Reaktion. Auch Gasser und Gasser (1971) konnten mit diesen Stämmen unter Verwendung von Antiserum gegen die L-LDH von *L.acidophilus* keine Immunreaktion nachweisen.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Bifidobakterien zumindest in bezug auf die L-LDH von den übrigen Milchsäurebakterien relativ weit entfernt stehen.

Vertreter der Gattung *Leuconostoc* konnten nicht in den immunologischen Vergleich mit einbezogen werden, da diese Stämme nur eine NAD-abhängige D-LDH besitzen. Wie jedoch die Arbeiten von Gasser und Gasser (1971) unter Verwendung von Antisera gegen die D-LDH-Asen von *L.leichmannii*, *L.jensenii* und *L.fermentum* zeigen, stehen die *Leuconostoc*-Stämme den heterofermentierenden Laktobazillen näher als den homofermentierenden.

In Übereinstimmung mit den Befunden von London und Chace (1976) über die immunologischen Beziehungen der Aldolasen innerhalb der Milchsäurebakterien sprechen auch die Ergebnisse unserer Untersuchungen für eine engere Beziehung von *L.casei* zu *P.cerevisiae* und *Sc. faecalis* als zu den Vertretern der Thermo- und Betabakterien.

Die immunologische Nichtidentität der L-LDH von *Sc.faecalis* (bzw. *Sc.faecium*) mit der von *L.acidophilus* bei Verwendung von anti-*L.casei* L-LDH stützt zudem die Meinung dieser Autoren, daß *L.acidophilus* und *Sc.faecalis* (bzw. *Sc.faecium*) bei der phylogenetischen Kartierung in verschiedener Richtung von *L.casei* angeordnet werden müssen. Auch die bereits erwähnte relativ geringe Ähnlichkeit der L-LDH von *L.xylosus* mit der von *L.casei* deckt sich mit den Befunden von London und Chace (1976).

Insgesamt läßt sich also eine gute Übereinstimmung zwischen den Ähnlichkeitsbeziehungen der Aldolasen und den der L-LDH-Asen feststellen. Man muß somit annehmen, daß sich Aldolase und L-LDH im Verwandtschaftskreis der Milchsäurebakterien mit ähnlichen Mutationsraten verändert haben.

Die Parallelität in der Entwicklung dieser beiden Enzyme ist gleichzeitig eine Bestätigung für die Annahme, daß die immunologisch erfaßbaren Ähnlichkeitsbeziehungen zwischen den L-LDH-Asen der Milchsäurebakterien tatsächlich die phylogenetischen Beziehungen dieser Organismen widerspiegeln.

T E I L II

Chemische Charakterisierung der allosterisch regulierbaren

L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus* und der nicht regu-

lierbaren L-LDH-asen von *L.plantarum* und *L.acidophilus*

1. Einleitung

Die L-LDH-asen verschiedener tierischer Gewebe wurden bereits sehr intensiv untersucht. So sind bisher die Primärstrukturen der Dornhai M_4 L-LDH (Taylor et al., 1973; Taylor et al., 1975; Taylor, 1977) und der Schweine M_4 bzw. H_4 L-LDH (Kiltz et al., 1977) aufgeklärt. Zusätzlich wurde auch die Röntgenstrukturanalyse der Dornhai M_4 L-LDH (Adams et al., 1970; Adams et al., 1973; cf. Holbrook et al., 1975) und der Schweine H_4 L-LDH (Eventhoff et al., 1975) mit hoher Auflösung durchgeführt.

Damit ist es möglich, Teilsequenzen auch noch nicht völlig sequenzierter L-LDH-asen anderer Organismen den entsprechenden Bereichen zuzuordnen. Die Kenntnis der strukturellen Abweichungen innerhalb funktionell wichtiger Teile der LDH-asen verschiedener Herkunft erlaubt nicht nur ein besseres Verstehen der enzymatischen Katalyse, sondern auch Einblicke in die Entwicklungsgeschichte des Enzyms.

So sind durch vergleichende Untersuchungen verschiedener L-LDH-asen einige Teilsequenzen als sehr konservativ bekannt. Einer dieser Bereiche umfaßt die funktionell sehr wichtige Region des sog. Loops (Dornhai L-LDH: Aminosäure 99 - 113; Taylor und Oxley, 1976; Taylor, 1977), der bei der NAD bzw. NADH-Bindung eine wichtige Rolle spielt (cf. Holbrook et al., 1975).

Auch die Aminosäuresequenz um das Histidin 193 (Taylor, 1977) erweist sich als sehr konservativ (cf. Holbrook et al., 1975; Taylor, 1977; Kiltz et al., 1977). Hier weiß man, daß das

Histidin 193 als Protonendonor bzw. Protonenakzeptor an der enzymatischen Katalyse unmittelbar beteiligt ist (cf. Holbrook et al., 1975).

Einen weiteren konservativen Teilbereich stellt die Sequenz um das sog. essentielle Cystein 163 (Dornhai L-LDH) dar. Dieser Bereich ist an der Substratbindung direkt beteiligt. Die Primärstruktur aus dieser Region konnte bei verschiedenen tierischen L-LDH-asen als homolog identifiziert werden (Fondy et al., 1965; Holbrook et al., 1967; Allison et al., 1969; Taylor et al., 1973; Taylor und Oxley, 1976; Kiltz et al., 1977; Wheat et al., 1977).

Röntgenstrukturanalysen an verschiedenen NAD-abhängigen Dehydrogenasen deckten darüber hinaus eine sehr konservative Tertiärstruktureinheit auf, die den Teil des Moleküls betrifft, der für die NAD-Bindung verantwortlich ist (cf. Rossmann, 1975). Diese Einheit umfaßt die Aminosäuren 22 - 163 (Dornhai L-LDH) und schließt somit auch den Bereich des Loops mit ein. Sehr ähnliche Strukturen wurden in allen bisher untersuchten nukleotidbindenden Enzymen gefunden.

Bemerkenswerterweise finden sich auch in Enzymen, die wie beispielsweise Subtilisin und Phosphoglyceratmutase zur enzymatischen Katalyse kein Nukleotid benötigen, Struktureinheiten, die mit den nukleotidbindenden Regionen der Kinasen und NAD-abhängigen Dehydrogenasen übereinstimmen (Rao und Rossmann, 1973; Campbell et al., 1974). Sequenzhomologien belegen dies zusätzlich: So konnte beispielsweise aus der Phosphoglyceratmutase ein in der Primärstruktur mit der Loopregion der L-LDH homologes Peptid isoliert werden (Rose et al., 1975).

Diese Beobachtung spricht dafür, daß zumindest diese Struktureinheiten der genannten Enzyme einen gemeinsamen Ursprung haben. Die im wesentlichen gute Übereinstimmung so verschiedenartiger Enzyme wie L-LDH und Subtilisin in bezug auf diese Struktureinheit läßt zudem den hohen konservativen Charakter dieses Bereichs erkennen.

Wie Tertiärstrukturuntersuchungen weiter beweisen (cf. Rossmann et al., 1975), stellt der Teil der nukleotidbindenden Enzyme (Aminosäure 163 - 329 der Dornhai L-LDH), der die Spezifität der enzymatischen Katalyse bestimmt (die sog. katalytische Region), einen zwar konservativen, im Vergleich zur NAD-bindenden Region jedoch wesentlich variableren Bereich dar; deutliche Gemeinsamkeiten in diesem Bereich lassen sich nur zwischen Enzymen erkennen, die sehr ähnliche Substrate umsetzen, wie beispielsweise zwischen L-LDH-asen und Malatdehydrogenasen (cf. Rossmann et al., 1975). Bei einem Vergleich der Primärstrukturen dieser beiden Dehydrogenasen finden sich besonders in dem bereits erwähnten Bereich um das Histidin 193 (Dornhai L-LDH) ausgeprägte Sequenzhomologien (Banaszak und Bradshaw, 1975).

Dagegen erweist sich der Übergangsbereich von nukleotidbindender und katalytischer Region um das Cystein 163 (Dornhai L-LDH), der bei der L-LDH einen Teil des substratbindenden Bereichs darstellt, als für diese Enzymspezies ausgesprochen charakteristisch. Für diesen letzteren Bereich werden zwar Sequenzhomologien der Laktatdehydrogenase zur Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase und zur Alkoholdehydrogenase diskutiert (Harris, 1964; Li und Vallee, 1964; Taylor et al., 1973), überzeugende Homologien sind jedoch nur zwischen L-LDH-asen verschiedener tierischer Gewebe (Fondy et al., 1965; Holbrook et al., 1967; Allison et al., 1969; Taylor et al., 1973; Kiltz et al., 1977; Wheat et al., 1977; Taylor und Oxley, 1976) gefunden worden.

Entsprechende Daten von bakteriellen L-LDH-asen liegen bisher noch nicht vor. Zwar wurde die Aminosäurezusammensetzung der L-LDH-asen von *Bacillus subtilis* (Yoshida und Freese, 1965), von *Streptococcus cremoris* (Jago et al., 1971) und der D-LDH von *Escherichia coli* (Tarmy und Kaplan, 1968) bestimmt, genauere vergleichend chemische Untersuchungen bakterieller L-LDH-asen, speziell Untersuchungen, welche die strukturellen Voraussetzungen der allosterischen Regulierbarkeit durch Fru-1,6-P₂ bzw. durch Fru-1,6-P₂ und Mn²⁺, einer nur bei bakteriellen

L-LDH-asen beobachteten Besonderheit, zu klären versuchen, wurden jedoch bisher nicht vorgenommen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den chemischen Eigenschaften der durch Fru-1,6-P₂ und Mn²⁺ regulierbaren L-LDH-asen von *L.casei* ssp. *casei* (ATCC 393) und *L.curvatus* (DSM 20010) sowie mit denen der nicht regulierbaren L-LDH-asen von *L.plan-tarum* ssp. *plantarum* (ATCC 14917) und *L.acidophilus* (DSM 20243). Sie versucht die Frage zu beantworten, ob sich signifikante Unterschiede zwischen regulierbaren und nicht regulierbaren L-LDH-asen finden lassen, die für das entsprechende enzymatische Verhalten verantwortlich sind. Zum anderen soll durch einen Sequenzvergleich der substratbindenden Region geklärt werden, ob sich die bakterielle und tierische L-LDH von einer gemeinsamen Ur-LDH ableiten lassen.

2. Ergebnisse

2.1 Reinigung der L-LDH-asen von L.plantarum und L.acidophilus

Die L-LDH-asen von L.plantarum und L.acidophilus wurden durch Hitzeschritt und Affinitätschromatographie über Oxamat-Sepharose und AMP-Sepharose zur Homogenität gereinigt.

Abfolge und Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte zeigt Tab. 1. Die Reinheit des Enzyms wurde nach jedem Reinigungsschritt durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese geprüft. Nach dem letzten Reinigungsschritt erwiesen sich beide L-LDH-asen als elektrophoretisch homogen (Abb. 1).



Abb. 1: Gel-Elektropherogramm verschiedener Enzymfraktionen während der Reinigung der L-LDH-asen von *L.plantarum* und *L.acidophilus*. Die Nummerierung der Fraktionen ist die gleiche, wie in Tab. 1. Nummer III' bezeichnet die Fraktion, wie sie nach der zweiten Trennung über die Oxamat-Sepharose-Säule erhalten wurde.

Tab. 1:

Reinigung der L-IDH von *L. plantarum* und *L. acidophilus*

Reinigungsschritt	<i>L. plantarum</i>			<i>L. acidophilus</i>		
	Anreicherung	Spez. Aktivität (U/mg Protein)	Ausbeute %	Anreicherung	Spez. Aktivität (U/mg Protein)	Ausbeute %
I. Rohextrakt	-	16	100	-	62	100
II. Hitzefällung	2,5	55	100	3,6	230	84
III. Affinitätschromatographie I	107	1750	75	32,5	2160	43
IV. Affinitätschromatographie II	145	2350	48	37,5	2460	22

2.2 Molekulargewicht der Untereinheiten der L-LDH-asen der

4 Milchsäurebakterien

Die Molekulargewichte der Untereinheiten der 4 im nativen Zustand als Tetramere vorliegenden L-LDH-asen (Mayr, 1977) wurden für diese Untersuchungen über SDS-Gel-Elektrophorese bestimmt. Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde in exponentiellen Polyacrylamid-Gradienten-Gelen (Mirault und Scherrer, 1971) durchgeführt. Als Referenzproteine dienen Lysozym und die verschiedenen Untereinheiten der DNS-abhängigen RNS-Polymerase von *L. curvatus* (Stetter und Zillig, 1974).

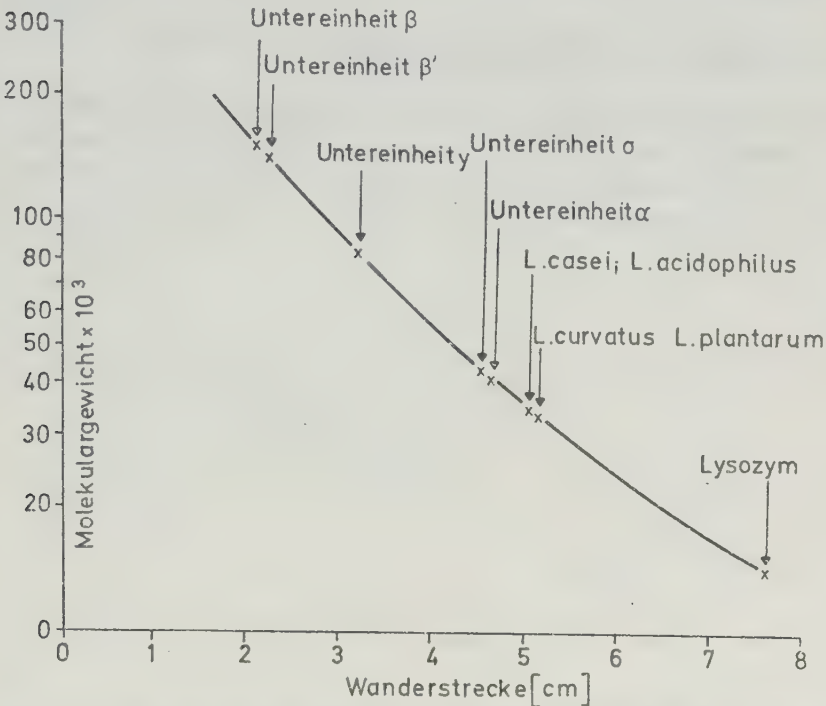


Abb. 2: Bestimmung des Molekulargewichtes über SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Molekulargewicht der Referenzproteine:

Lysozym aus Hühnerei (14 000);

Untereinheiten der DNS-abhängigen RNS-Polymerase von *L. curvatus* (Stetter und Zillig, 1974):

Untereinheit α (42 500);

Untereinheit α' (44 000);

Untereinheit γ (84 000);

Untereinheit β' (145 000);

Untereinheit β (151 000)

Bei niedrigeren Molekulargewichten als 50 000 wurde eine deutliche Abweichung von der linearen Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und elektrophoretischer Beweglichkeit festgestellt (Abb. 2). Diese Beobachtung stimmt mit der von Gonenne und Lebowitz (1974) beschriebenen Abweichung von der linearen Beziehung zwischen Molekulargewicht und Retardations-Koeffizient bei kleineren Proteinen (MG 50 000) überein.

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, beträgt das Molekulargewicht der Untereinheiten der 4 Laktatdehydrogenasen 34 000 (L-LDH von *L.curvatus* und *L.plantarum*) bzw. 35 000 (L-LDH von *L.casei* und *L.acidophilus*).

2.3 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Die 4 L-LDH-asen zeigten bei der Elektrofokussierung sehr scharfe Proteinbanden. Der isoelektrische Punkt für *L.casei* liegt bei pH 5,3 , für *L.acidophilus* bei pH 5,1 , für *L.curvatus* bei pH 4,9 und für *L.plantarum* bei pH 4,4 (Abb. 3).

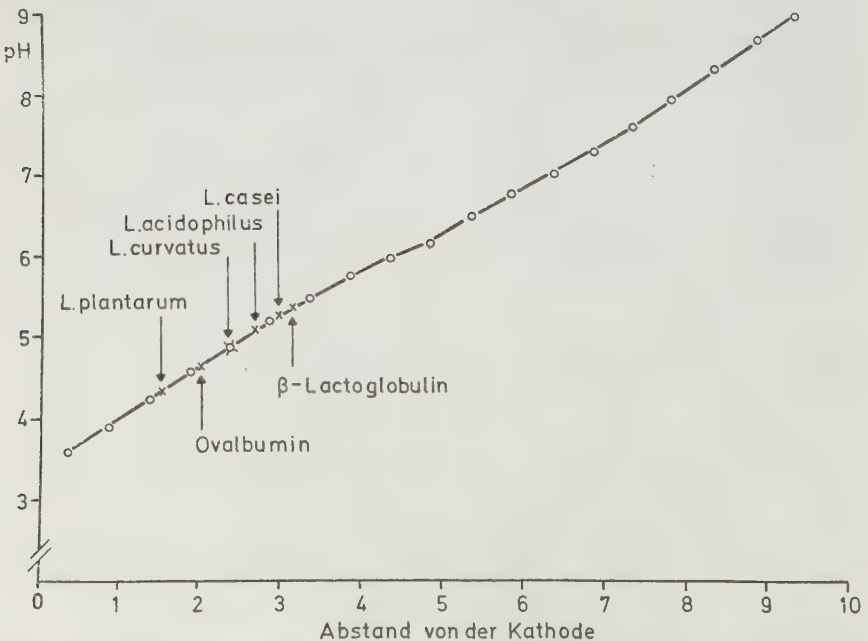


Abb. 3: Bestimmung des isoelektrischen Punktes der 4 L-LDH-asen

Die Werte der als Referenz benützten Proteine von Ovalbumin und β -Lactoglobulin stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (Young, 1963): pH 4,6 für Ovalbumin (hier wurde die mittlere von 3 Banden bestimmt) und pH 5,4 für β -Lactoglobulin (dieser Wert gilt für die stärkere von zwei Banden).

2.4 Aminosäurezusammensetzung

Das Ergebnis der Aminosäureanalyse ist in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tab. 2:

Gesamtaminosäurezusammensetzung der 4 L-LDH-asen

Amino- säure	L.casei		L.curvatus		L.acidophilus		L.plantarum	
	Mol (%)	Anzahl pro Unterein- heit a)	Mol (%)	Anzahl pro Unterein- heit b)	Mol (%)	Anzahl pro Unterein- heit a)	Mol (%)	Anzahl pro Unterein- heit b)
Try	0,36	1,2	1,0	3,1	0,63	2,0	0,25	0,8
Lys	7,6	24,2	7,1	21,9	6,8	21,5	7,2	22,3
His	1,7	5,3	1,6	4,8	2,6	8,2	1,1	3,3
Arg	2,7	8,5	2,4	7,3	3,0	9,7	3,4	10,7
Cys-Säure	0,35	1,1	0,7	2,2	0,37	1,2	0,5	1,6
Asp	12,5	39,7	10,4	32,0	10,2	32,5	12,9	40,0
Met- Sulphon	2,1	6,7	2,5	7,8	3,0	9,4	3,0	9,3
Thr	5,5	17,4	5,6	17,2	5,3	16,8	4,7	14,4
Ser	5,9	18,7	6,5	20,0	5,6	17,9	7,0	21,5
Glu	8,9	28,5	10,0	30,8	11,1	35,2	8,6	26,6
Pro	4,2	13,2	4,5	13,8	4,0	12,8	3,9	12,0
Gly	7,5	24,0	7,8	24,2	9,5	30,4	10,2	31,6
Ala	10,7	34,2	10,4	32,2	9,8	31,3	10,5	32,4
Val	7,4	23,6	6,8	20,9	8,9	28,3	7,2	22,1
Ile	8,6	27,4	9,5	29,3	6,0	19,0	5,5	17,0
Leu	7,7	24,6	7,7	23,8	8,4	26,7	9,0	27,7
Tyr	3,2	10,1	2,5	7,7	2,3	7,3	1,8	5,5
Phe	3,1	9,7	3,1	9,7	2,5	8,0	3,3	10,2
Summe	100	318,1	100	308,7	100	318,2	100	309,0

a) b) Die Werte wurden aufgrund der Molekulargewichte der L-LDH-Untereinheiten von 35 000 (a) bzw. von 34 000 (b) berechnet.

Tab. 3:

Anzahl der Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Reste pro L-LDH-Untereinheit
sowie ihr Anteil an der Gesamtzahl aller geladenen Aminosäuren

Herkunft der L-LDH	Anzahl der sauren Aminosäurereste Asp und Glu	Anzahl der basischen Aminosäurereste Arg, His und Lys	Anteil von Asp und Glu an der Gesamtzahl aller geladenen Aminosäuren %
L. curvatus	63	34	65
L. casei	69	38	64,5
L. plantarum	67	36	65
L. acidophilus	68	40	63

Der Berechnung für die Anzahl der Aminosäuren einer Enzymuntereinheit wurde ein Durchschnittsmolekulargewicht von 110 pro Aminosäure zugrunde gelegt. Der Amidstickstoff wurde nicht bestimmt. Deshalb kann unter Berücksichtigung des Gehalts an geladenen Aminosäurereste und des isoelektrischen Punktes der jeweiligen L-LDH nur eine relative Aussage über den Amidierungsgrad der hier untersuchten L-LDH-asen gemacht werden. Da sich die isoelektrischen Punkte der L-LDH-asen deutlich voneinander unterscheiden, die Anzahl der sauren und der basischen Aminosäuren jedoch ebenso wie der Anteil der sauren Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure) an der Gesamtzahl aller geladenen Aminosäuren bei diesen 4 L-LDH-asen sehr ähnlich ist (Tab. 3), kann eine Abnahme der Amidierung in folgender Reihe angenommen werden:

L.casei > *L.acidophilus* > *L.curvatus* > *L.plantarum*

2.5. Reaktion mit Iodacetamid und para-Hydroxymercuribenzoat zur Blockierung von SH-Gruppen

Um einen essentiellen Cysteinrest, wie er in den meisten bisher untersuchten L-LDH-asen festgestellt werden konnte, auch in den Enzymen von *L.casei*, *L.curvatus* und *L.acidophilus* nachzuweisen, wurden entsprechende Proteinmengen (0,1 mg/ml) bei pH 8,3 in Gegenwart oder in Abwesenheit von 8 M Harnstoff 6 h mit 1,2 mM (*L.casei*, *L.acidophilus*) bzw. mit 2,4 mM (*L.curvatus*) Jodacetamid oder p-HMB inkubiert. Die Konzentration der Thiol-Inhibitoren entspricht dabei einem 400fachen molaren Überschuß über die ermittelten Cysteinreste der jeweiligen L-LDH-asen.

Um nach der Inkubation bei pH 8,3 mit oder ohne Harnstoff eine Reassoziaton bzw. Renaturierung der Enzyme zu erzielen, wurden die Enzyme 24 h gegen 10 mM Imidazol-Puffer (pH 6,5), der zusätzlich 6 mM Mn^{2+} und 1 mM Fru-1,6- P_2 enthielt, dialysiert. Die Enzymaktivitäten wurden anschließend im Standard-Enzymtest bestimmt.

Tab. 4:

Hemmung der L-LDH-Aktivität nach 6 h Inkubation mit einem 400fachen Überschuß (Mol Inhibitor/Mol Enzym-Cystein) an Iodacetamid bzw. p-Hydroxymercuribenzoat
Die Enzymaktivität vor der Inkubation wurde 100 % gesetzt.

Reaktions-Bedingungen		% Aktivität nach Inkubation und Reaktivierung		
		L. curvatus	L. casei	L. acidophilus
ohne Harn- stoff	+ p-Hydroxymercuribenzoat	96	52	84
	+ Iodacetamid	100	35	76
	ohne Inhibitor	100	55	100
mit 8 M				
Harn- stoff	+ p-Hydroxymercuribenzoat	80	49	72
	+ Iodacetamid	77	35	54
	ohne Inhibitor	84	49	88

Wie aus der Tab. 4 hervorgeht, vermag p-HMB die Aktivität der Enzyme praktisch nicht zu beeinflussen. Nur im Fall von *L.acidophilus* ist eine leichte Aktivitätsabnahme von 16 % feststellbar. Jodacetamid ist völlig unwirksam gegenüber der *L.curvatus* L-LDH, hemmt aber die Aktivität der L-LDH-asen von *L.casei* und *L.acidophilus* um etwa 15 bzw. 30 % . Zwischen den mit und ohne Harnstoff denaturierten Proben konnte kein Unterschied beobachtet werden.

Die nur leichte Hemmung der Laktobazillen L-LDH-asen nach Inkubation mit einem extrem hohen Überschuß an Thiol-Reagenzien muß wohl auf unspezifische Reaktionen mit anderen Aminosäureresten wie Histidin- oder Lysinresten zurückgeführt werden (cf. Gurd, 1972). Die Ergebnisse dieser Versuche lassen somit keinen Hinweis auf das Vorliegen essentieller Thiolgruppen in diesen L-LDH-asen zu.

2.6 N- und C-terminale Aminosäure

Mit Hilfe der Dansyltechnik (Hartley, 1970) wurde als N-terminale Aminosäure Alanin für die L-LDH von *L.casei* und *L.curvatus* und Prolin für die L-LDH von *L.acidophilus* und *L.plantarum* identifiziert.

Nach Inkubation mit Carboxypeptidase A konnte Phenylalanin als C-terminale Aminosäure für die *L.casei*- und *L.curvatus* L-LDH bestimmt werden. Während bei den L-LDH-asen von *L.plantarum* und *L.acidophilus* keine Abspaltung einer Aminosäure mit Carboxypeptidase A beobachtet wurde, setzte Carboxypeptidase C schließlich Serin bei diesen L-LDH-asen frei. Somit stellt Serin die C-terminale Aminosäure der nicht allosterischen Enzyme von *L.plantarum* und *L.acidophilus* dar.

2.7 Kartierung der Bromcyanpeptide

Wie Abb. 4 zeigt, ist das Peptidmuster der L.casei und L.curvatus L-LDH nach zweidimensionaler elektrophoretischer Auftrennung der Bromcyanfragmente im Polyacrylamid-Gel voneinander sehr verschieden. Allenfalls handelt es sich bei Peptid 1 um einen beiden L-LDH-asen gemeinsamen Teilbereich der Primärstruktur.

Aufgrund der Anzahl an Methioninresten der L-LDH-asen von L.casei und L.curvatus müßte man 8 bzw. 9 Peptide erwarten. Da sich jedoch nur je 7 deutlich anfärbbare Peptide erkennen lassen, muß man annehmen, daß nicht an allen vorhandenen Methioninresten gespalten wurde oder daß 2, evtl. sogar 3 Methioninreste in der Sequenz hintereinanderliegen.

Bei der L.casei L-LDH ist wohl Peptid 6' und 7' mit Peptid 6 bzw. 7 identisch. Die Aufspaltung in 2 eng hintereinanderliegende Flecken ist vermutlich auf das Gleichgewicht zwischen dem bei der Bromcyanreaktion aus Methionin entstandenen C-terminalen Homoserin-Lacton und Homoserin zurückzuführen (Armstrong, 1949).

2.8 Kartierung der tryptischen Peptide

Abb. 5 zeigt die zweidimensionale Auftrennung der tryptischen Peptide der 4 L-LDH-asen von L.casei, L.curvatus, L.plantarum und L.acidophilus. Diese tryptischen Fingerprints stellen das Ergebnis mindestens dreier Parallelversuche dar.

In Übereinstimmung mit der Anzahl der Lysin- und Argininreste, die aus der Gesamtaminosäurezusammensetzung unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der L-LDH-Untereinheiten ermittelt werden können (Tab. 2), werden hier 33 - 36 tryptische Peptide für jedes Enzym gefunden. Auch die Anzahl der durch spezielle Färbungen erkennbaren Histidin- und Arginin-haltigen Peptide stimmt sehr gut mit der bei der Gesamtaminosäurebestimmung ermittelten Zahl an Histidin- bzw. Argininresten pro Untereinheit überein (Abb. 5; Tab. 7).

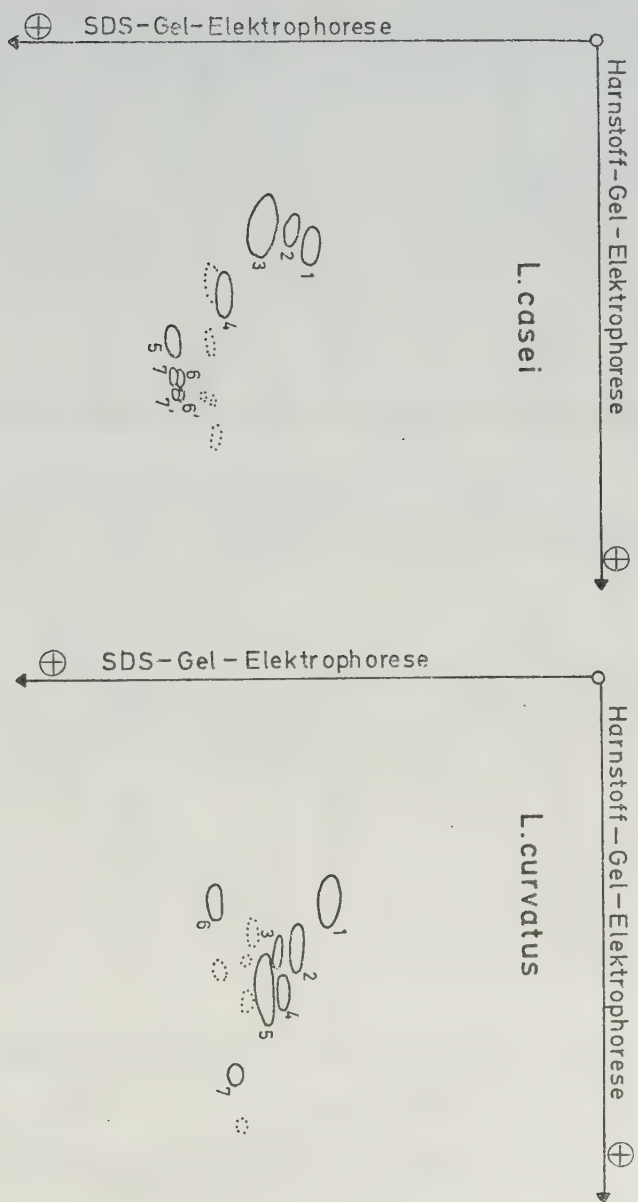


Abb. 4:

Kartierung der Bromcyan-Peptide der L-LDH-asen von *L. casei* und *L. curvatus*



Abb. 5:

Kartierung der tryptischen Peptide der 4 L-LDH-asen

Die Proben wurden strichförmig am Schnittpunkt der Koordinaten aufgetragen.

-  Fluoreszenz unter UV-Licht; diese Peptide enthalten somit aromatische Aminosäurereste
-  positive Reaktion auf Arginin
-  positive Reaktion auf Histidin

Die 4 Fingerprints unterscheiden sich sehr deutlich voneinander: Es konnte weder eine bevorzugte Ähnlichkeit zwischen den beiden allosterischen bzw. nicht allosterischen Enzymen noch zwischen 2 Enzymen aus beiden Gruppen gefunden werden. Bei jeder Kombination erscheinen lediglich 10 bis 15 Peptide homotop. Maximal 4 Peptide können in allen 4 Fingerprints an ähnlicher Position gefunden werden. Es sind dies Lys₂ (bei L.plantarum entspricht dieses Peptid entweder Lys_{2?} oder Arg₁), Lys₁₅, Arg₆ und Arg₇. Alle hier mit "Arg" gekennzeichneten Peptide ergaben nach Behandlung mit Phenanthrenchinon positive Reaktion auf Arginin.

2.8.1 Chemische Charakterisierung verschiedener tryptischer Peptide

Um zu prüfen, inwieweit homotope Peptide tatsächlich auch homologe Primärstrukturen aufweisen, wurden Lys₂ (bei L.plantarum Lys_{2?} und Arg₁) und Arg₆ isoliert, hydrolysiert und auf ihre Aminosäurezusammensetzung untersucht.

Da man bei den Peptiden Lys₁₅ und Arg₇ aufgrund ihrer außerordentlich großen elektrophoretischen Beweglichkeit (Abb. 5) annehmen muß, daß es sich um sehr kleine Spaltprodukte handelt - bei Arg₇ könnte es sich sogar um freies Arginin handeln - , die für einen Strukturvergleich nur wenig Aussagekraft haben, wurden sie nicht näher untersucht.

Tab. 5:

Aminosäurezusammensetzung der Arg₆-Peptide

Aminosäure	L.casei	L.curvatus	L.plantarum	L.acidophilus
Arg	1 (1,1)	1 (0,97)	1 (1,09)	1 (0,93)
Asp	1 (1,04)	1 (1,09)	1 (1,21)	1 (1,05)
Thr	2 (1,63)	1 (1,03)	1 (0,98)	2 (2,02)
Ser	2 (1,98)	3 (2,78)	4 (3,65)	2 (1,83)
Gly	2 (2,18)	2 (1,98)	2 (1,99)	3 (3,06)
Ala	1 (1,06)	1 (1,07)	-	-
Val	2 (1,2) (2,2)*	1 (0,52)	1 (0,61)	1 (0,61)
Ile	-	1 (0,5)	1 (0,52)	1 (0,52)
Leu	1 (0,88)	1 (1,08)	1 (1,07)	1 (1,12)

* nach 72 h Hydrolyse

Die Zahlen in Klammern geben die unmittelbar bestimmten Werte an.

2.8.1.1 Aminosäurezusammensetzung des Arg₆-Peptids

Die Aminosäurezusammensetzung der Arg₆-Peptide (Abb. 5) wurde nach 20 h Salzsäurehydrolyse bestimmt. Jedes der 4 Peptide enthält 12 Aminosäuren.

Die niedrige Ausbeute an Isoleucin und Valin kann damit erklärt werden, daß eine evtl. hier vorhandene Valin-Isoleucin bzw. eine Valin-Valin-Bindung durch 20 h Salzsäurehydrolyse nur teilweise gespalten wird. Eine auf 72 h verlängerte Hydrolyse des Arg₆-Peptids von L.casei führt denn auch zu einer doppelten Ausbeute an Valin. Man kann deshalb annehmen, daß zwei Valin bzw. Isoleucin und Valin in der Sequenz dieses Peptids aufeinanderfolgen.

Der chemische Charakter aller 4 Peptide aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung ist auffallend ähnlich. Keines besitzt Cystein. Das Fehlen von Cystein wird auch durch die Beobachtung bestätigt, daß das chromatographische und elektrophoretische Verhalten der Peptide gleich bleibt, unabhängig davon, ob die tryptische Spaltung mit oxydiertem oder nativem Enzym durchgeführt wurde. Der Tryptophangehalt dieses Peptids wurde nicht bestimmt. Für das Fehlen von Tryptophan spricht aber die Tatsache, daß in keinem Fall vor dem Besprühen der Fingerprints eine Fluoreszenz der Arg₆-Peptide festgestellt werden konnte.

2.8.1.2 Aminosäurezusammensetzung des Lys₂-Peptids

Wie Tab. 6 zeigt, stimmt die Aminosäurezusammensetzung der Lys₂-Peptide von L.casei, L.curvatus und L.acidophilus weitgehend überein. Zwar umfaßt das L.casei-Peptid 20 Aminosäurereste, während das von L.curvatus und L.acidophilus 2 weniger aufweist, doch deutet das Vorkommen der relativ seltenen Aminosäuren Histidin, Methionin und Prolin in allen drei Fällen daraufhin, daß es sich hier um einen entsprechenden Teilbereich in der Primärstruktur handeln könnte.

Die starke Abweichung in der Aminosäurezusammensetzung des elektrophoretisch beweglicheren Lys₂-Peptids von L.plantarum macht deutlich,

Tab. 6:

Aminosäurezusammensetzung der Lys₂-Peptide der
4 L-LDH-asen und des Arg₁-Peptids von L.plantarum

Aminosäure	L.casei (Lys ₂)	L.curvatus (Lys ₂)	L.acidophilus (Lys ₂)	L.plantarum (Lys ₂ ?)	L.plantarum (Arg ₁)
Lys	1 (1,20)	1 (0,92)	1 (1,17)	1 (1,15)	-
His	1 (0,90)	1 (1,31)	1 (0,90)	-	1 (0,73)
Arg	-	-	-	-	1 (1,42)
Asp	3 (2,92)	1 (1,09)	1 (1,20)	2 (1,69)	1 (1,28)
Met Sulphon	1 (0,91)	1 (1,16)	1 (0,97)	-	1 (0,67)
Thr	1 (1,09)	2 (1,58)	-	1 (1,07)	2 (1,92)
Ser	1 (0,99)	3 (2,93)	1 (0,90)	-	2 (1,61)
Glu	5 (5,37)	2 (2,38)	5 (4,68)	1 (1,19)	1 (1,20)
Pro	1 (1,14)	1 (0,87)	1 (1,04)	1 (0,60)	1 (0,64)
Gly	1 (0,77)	1 (0,76)	1 (1,12)	1 (0,66)	2 (2,18)
Ala	-	1 (1,05)	2 (2,15)	2 (2,25)	3 (2,82)
Val	-	-	1 (0,66)	-	1 (1,09)
Ile	3 (2,68)	2 (2,12)	1 (0,63)	-	1 (1,09)
Leu	2 (1,78)	2 (1,82)	2 (1,87)	1 (0,99)	-
Tyr	-	-	-	-	1 (0,65) ^x
Phe	-	-	-	1 (0,58)	-
Summe	20	18	18	11	18

^x nicht korrigiert

daß es sich hier um ein Peptid anderer Herkunft handeln muß (Tab. 6): Weder Histidin noch Methionin sind nachweisbar; außerdem ist dieses Peptid mit 11 Aminosäuren deutlich kleiner als die Lys_2 -Peptide von *L.casei*, *L.curvatus* und *L.acidophilus*.

Dagegen läßt das Arg_1 -Peptid von *L.plantarum* eine deutliche Ähnlichkeit mit den genannten Peptiden erkennen sowohl in bezug auf die Gesamtzahl der Aminosäuren (18 Aminosäuren) als auch in bezug auf die charakteristische Aminosäurekombination von Prolin, Methionin und Histidin. Allerdings ist hier Lysin durch Arginin ersetzt.

Tryptophan konnte bei diesen Peptiden wegen Materialknappheit nicht bestimmt werden.

3. Diskussion

Die L-LDH-asen der 4 verschiedenen Laktobazillen sind aus je 4 Untereinheiten zusammengesetzt (Mayr, 1977), die ein Molekulargewicht von 34 000 bzw. 35 000 aufweisen. Diese Werte stimmen mit den Befunden anderer Autoren für die L-LDH-asen von *L. plantarum* (Wilson et al., 1964), von *L. acidophilus* (Gasser et al., 1970) und *L. casei* (Gordon und Doelle, 1976) überein.

Für das Vorliegen von identischen Untereinheiten spricht das Auftreten von nur je 1 Proteinbande bei der SDS-Gel-Elektrophorese und bei der isoelektrischen Fokussierung.

Die proteinchemischen Untersuchungen zeigen besonders eindeutig die Gleichartigkeit der Untereinheiten: So wurde nur je 1 Aminosäure als N-terminales bzw. C-terminales Ende gefunden. Auch die Anzahl der nach Spaltung mit Trypsin oder Bromcyan gefundenen Peptide entspricht der für das Molekulargewicht der Untereinheiten aus der Gesamtaminosäurezusammensetzung ermittelten Anzahl an Lysin- und Arginin- bzw. Methioninresten (Tab. 7).

Abweichend von den tierischen L-LDH-asen, bei denen die N-terminale Aminosäure acetyliert vorliegt, besitzen die 4 Enzyme der Laktobazillen eine freie Aminogruppe. Während jedoch die allosterischen Enzyme von *L. casei* und *L. curvatus* als N-terminale Aminosäure Alanin wie alle bisher untersuchten tierischen L-LDH-asen und als C-terminale Aminosäure Phenylalanin wie alle bisher untersuchten tierischen L-LDH-asen des M-Typs besitzen, wurden für die nicht-allosterischen Enzyme von *L. acidophilus* und *L. plantarum* Prolin als N-terminale Aminosäure und Serin als C-terminale Aminosäure gefunden. Diese Aminosäuren treten bei keiner bisher untersuchten LDH als Termini auf (Abb. 6).

Tab. 7:

Vergleich der Anzahl der nach Spaltung mit Trypsin bzw. Bromcyan erhaltenen Peptide mit der aufgrund der Gesamtaminosäurezusammensetzung und des Molekulargewichts der L-LDH-Untereinheiten erwarteten Anzahl

In den Vergleich wurden auch die spezifisch auf Histidin und Arginin anfärbbaren tryptischen Peptide einbezogen.

Herkunft der L-LDH	tryptische Peptide						Bromcyan-Peptide	
	Gesamtanzahl		Histidin		Arginin		Gesamtanzahl	
	erhalten	erwartet	erhalten	erwartet	erhalten	erwartet	erhalten	erwartet
L. casei	36	34	4	5	7	9	7	8
L. curvatus	33	30	5	5	8	7	7	9
L. plantarum	33	34	4	3	12	11	0	10
L. acidophilus	36	33	6-7	8	7-8	10	0	10

O = nicht bestimmt

	<u>N-terminales Ende</u>	<u>C-terminales Ende</u>
Dornhai M ₄ ^{1,2,3}	N-acetyl-Ala-Thr-	-Leu-Lys-Phe
Schwein M ₄ ^{4,5}	N-acetyl-Ala-Thr-	-Leu-Glu-Phe
Ratte M ₄ ^{6,7}	N-acetyl-Ala-Ala-	-Phe
Kaninchen M ₄ ^{6,7}	N-acetyl-Ala-Ala-	-Phe
Schwein H ₄ ^{4,5}	N-acetyl-Ala-Thr-	-Leu-Lys-Asp-Leu
Rind H ₄ ⁸	N-acetyl-Ala-Thr-	-Leu
Huhn H ₄ ^{6,7}	N-acetyl-Ala-Thr-	-Leu
L.casei	Ala-	-Phe
L.curvatus	Ala-	-Phe
L.plantarum	Pro-	-Ser
L.acidophilus	Pro-	-Ser

Abb. 6:

Vergleichende Gegenüberstellung der N- bzw. C-terminalen Enden der 4 Laktobazillen L-LDH-asen mit den bereits bekannten Termini verschiedener tierischer L-LDH-asen

- | | |
|------------------------|----------------------------|
| 1 Allison, 1968 | 5 Kiltz et al., 1977 |
| 2 Taylor, et al., 1973 | 6 Pfeleiderer et al., 1970 |
| 3 Taylor, 1977 | 7 Holbrook et al., 1975 |
| 4 Mella et al., 1969 | 8 Stegink et al., 1971 |

Ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der L-LDH-asen zeigt gewisse Eigenheiten, die für entsprechende Organismengruppen charakteristisch sein könnten: Einmal treten in fast allen tierischen Enzymen 4 oder mehr Cysteinreste pro Untereinheit auf (Wachsmuth et al., 1964; Fondy et al., 1965), während die L-LDH-asen der 4 Laktobazillen und die von *Sc. cremoris* (Dynon et al., 1972) nur 1 - 2 Cysteinreste besitzen. Da auch 4 Cysteinreste in der L-LDH von *Bacillus subtilis* (Yoshida und Freese, 1965) und 3 Cysteinreste in der D-LDH von *E.coli* (Tarmy und Kaplan, 1968)

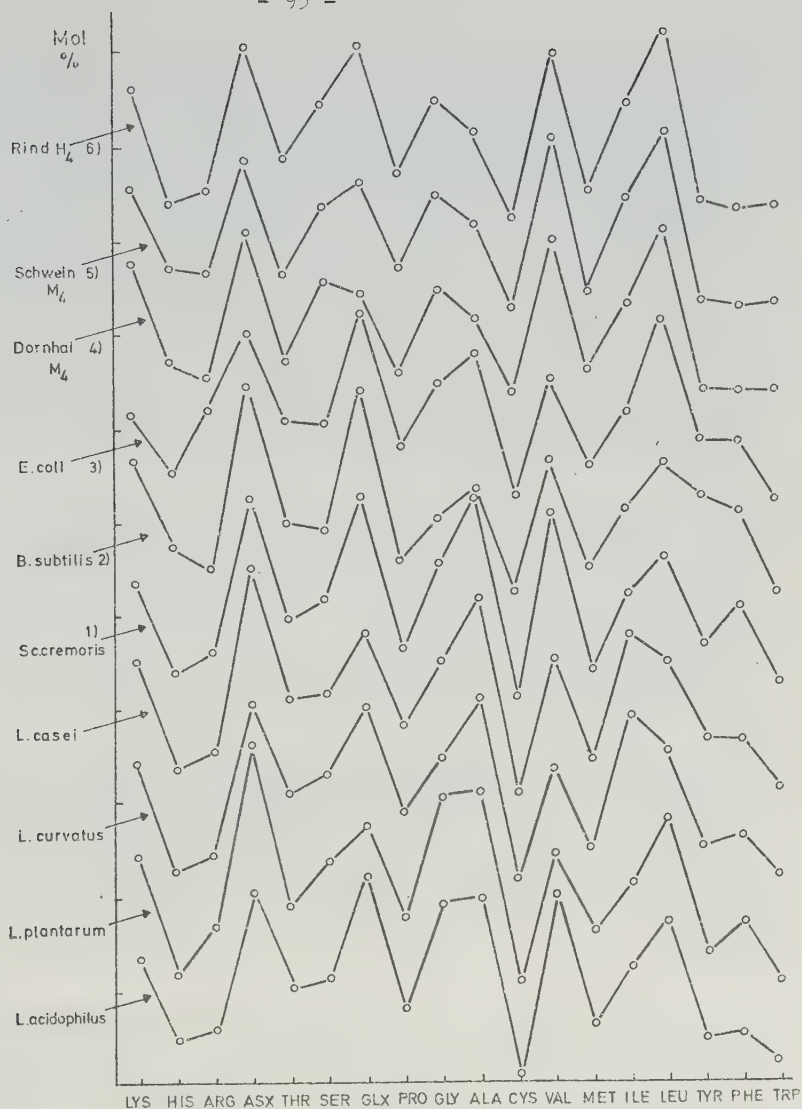


Abb. 7: Vergleichende Darstellung der Aminosäurezusammensetzung verschiedener tierischer und bakterieller L-LDH-asen einschließlich der D-LDH von *E. coli*. Ein Teilbereich auf der Ordinate entspricht 5 Mol % der jeweiligen Aminosäure. Die Werte für die Dornhai M_4 und Schweine M_4 L-LDH wurden aufgrund der entsprechenden Sequenzanalysen berechnet.

1 Jago et al., 1971

2 Yoshida und Freese, 1965

3 Tarmy und Kaplan, 1968

4 Taylor, 1977

5 Kiltz et al., 1977

6 Pesce et al., 1967

gefunden wurden, könnte der niedrige Cysteingehalt zwar nicht für die Enzyme der Bakterien allgemein, sondern nur für die der Milchsäurebakterien typisch sein.

Zum anderen liegt die Zahl der Glycinreste bei allen tierischen L-LDH-asen deutlich höher als die der Alaninreste (Wachsmuth et al., 1964; Pesce et al., 1967; Goldberg, 1972; Kiltz et al., 1977; Taylor, 1977), während bei allen bakteriellen Enzymen einschließlich der D-LDH von *E.coli* die Alaninreste überwiegen. Dabei fällt auf, daß der Anteil von Alanin im Vergleich zu dem von Glycin bei den allosterischen Enzymen von *L.casei*, *L.curvatus* und *Sc. cremoris* besonders hoch ist, während die Anteile von Glycin und Alanin bei den nicht-allosterischen Enzymen fast gleich sind (Abb. 7).

Zum dritten unterscheiden sich die 2 allosterischen Enzyme von *L.casei* und *L.curvatus* deutlich von allen anderen LDH-asen sowohl tierischer wie bakterieller Herkunft durch ihren ausgesprochen hohen Isoleucin-Gehalt. Dies fällt besonders dann auf, wenn man den Anteil von Isoleucin mit dem von Valin oder Leucin vergleicht. Die Enzyme von *L.casei* und *L.curvatus* sind die einzigen bisher bekannten LDH-asen, bei denen der Anteil an Isoleucin größer ist als der von Leucin oder Valin.

Die Unterschiede zwischen den 2 allosterischen Enzymen und den 2 nicht-allosterischen Enzymen sowohl in bezug auf ihre Aminosäurezusammensetzung als auch in bezug auf den Besitz verschiedener N- und C-terminalen Aminosäuren könnten auf deutliche Abweichungen in der Aminosäuresequenz der beiden Enzymgruppen hinweisen.

Darüberhinaus deutet die zwischen den 4 Laktobazillen L-LDH-asen aufgedeckte Verschiedenheit der isoelektrischen Punkte und der nach Spaltung mit Trypsin oder Bromcyan erhaltenen Peptidmuster auf eine beachtliche Heterogenität in der Aminosäuresequenz schon innerhalb der beiden Enzymgruppen hin.

Trotz dieser Unterschiede weisen die isolierten tryptischen Peptide Lys_2 (bzw. Arg_1 bei *L.plantarum*) und besonders Arg_6 eine ausgesprochen einheitliche Zusammensetzung auf. So spricht

das Vorkommen der relativ seltenen Aminosäuren Histidin, Prolin und Methionin in den 3 Lys₂-Peptiden von *L.casei*, *L.curvatus* und *L.acidophilus* bzw. in dem Arg₁-Peptid von *L.plantarum* sowie der ausgesprochen ähnliche chemische Gesamtcharakter dieser Peptide dafür, daß es sich hier um einen allen 4 Enzymen gemeinsamen Teilbereich der Primärstruktur handelt.

Wie ein Vergleich mit den bereits bekannten Sequenzen der Schweine M₄ und H₄ L-LDH (Kiltz et al., 1977) sowie der Dornhai M₄ L-LDH (Taylor, 1977) zeigt, kann dieses Peptid nicht sicher einem bestimmten Sequenzbereich dieser Vertebraten L-LDH-asen zugeordnet werden. Um zuverlässige Aussagen machen zu können, sind hier entsprechende Sequenzanalysen unbedingt erforderlich.

Dagegen gleicht die Aminosäurezusammensetzung des isolierten Arg₆-Peptids aller 4 Laktobazillen L-LDH-asen dem entsprechenden Peptid der L-LDH von Hummer (Taylor und Oxley, 1976) in auf-fallender Weise. Dieses Peptid ist einem Bereich aus der substrat-bindenden Region der Dornhai L-LDH homolog. Es enthält das Arginin 169, das an der Substratbindung direkt beteiligt ist.

In Abb. 8 wurden, auch wenn die Sequenz noch nicht bestimmt werden konnte, die Aminosäuren entsprechend den bereits bekannten Teilsequenzen der L-LDH-asen von Hummer und verschiedener Vertebraten angeordnet. Wie im Enzym von Hummer ist auch bei den Laktobazillen L-LDH-asen Cystein 163, von dem man annahm, daß es für die Enzymaktivität unbedingt erforderlich ist (Fondy et al., 1967; cf. Holbrook et al., 1965), durch Threonin ersetzt.

Diese Tatsache kann die Unempfindlichkeit der Laktobazillen L-LDH-asen gegenüber den SH-Giften Jodacetamid und p-HMB erklären; alle anderen Enzyme mit Ausnahme der Heilbutt L-LDH (Fondy et al., 1965) und der L-LDH-X aus Mäusehoden (Goldberg, 1972) werden durch diese SH-Gifte in ihrer Aktivität gehemmt.

Wie das Beispiel der L-LDH-X aus Mäusehoden zeigt, ist allerdings die Nichthemmbarkeit durch Jodacetamid und p-HMB kein direkter Beweis dafür, daß ein nicht hemmbares Enzym auch kein Cystein 163

im aktiven Zentrum besitzt: Obwohl dieses Isoenzym aus Mäusehoden unempfindlich gegenüber SH-Giften ist, weist es die gleiche Sequenz in diesem Bereich - einschließlich des Cysteins 163 - wie die M_4 bzw. H_4 L-LDH von Schwein, Rind oder Kaninchen auf (Wheat et al., 1977). Möglicherweise sind Änderungen in anderen Sequenzbereichen, die zu einer geringfügigen sterischen Umgestaltung der substratbindenden Tasche führen, dafür verantwortlich, daß eine Blockierung der SH-Gruppe des Cystein 163 ohne Einfluß auf die enzymatische Aktivität dieser L-LDH bleibt (Wheat et al., 1977).

Erstaunlicherweise zeigt sich auch die L-LDH von Hummer gegenüber SH-Giften sehr empfindlich, obwohl sie kein Cystein 163 besitzt (Fondy et al., 1967; Taylor und Oxley, 1976). In diesem Enzym wurden 1 oder 2 Cysteine mehr gefunden als in den Laktobazillen-Enzymen. Einer dieser Cysteinreste muß demnach an einer für die Enzymaktivität ebenfalls "essentiellen" Stelle vorkommen, die jedoch nicht mit Position 163 identisch ist.

Eine weitere Abweichung von der Aminosäurezusammensetzung der sequenzierten Peptide ist dadurch gegeben, daß in der Aminosäurezusammensetzung der Laktobazillen L-LDH-asen anstelle von je 2 Asparaginsäure- und Serinresten nur 1 Asparaginsäurerest und 3 Serinreste vorliegen. Das bedeutet, daß entweder Asparaginsäure 166 oder Asparagin 164 durch Serin ausgetauscht wurde. Wir ersetzen in Abb. 8 Asparagin 164 durch Serin, da sich Serin von Asparagin nur durch den Austausch einer Base des Codons unterscheidet. Darüberhinaus scheint Asparaginsäure an Position 166 für die enzymatische Aktivität essentiell zu sein, da sie wahrscheinlich eine Ionenbindung mit Histidin 193 (cf. Holbrook et al., 1975) ausbildet, während Asparagin 164 nur über eine Wasserstoffbrückenbildung mit Serin 252 (cf. Holbrook et al., 1975) verbunden ist, das nicht direkt zum Reaktionszentrum gehört.

Der Austausch in Position 159, 167 und 168 innerhalb der Arg_6 -Peptide der Laktobazillen L-LDH-asen erscheint geringfügig. Die Codons der ausgetauschten Aminosäuren (Isoleucin gegen Valin, Serin gegen Threonin und Alanin gegen Glycin) unterscheiden sich

nur durch einen Basenaustausch, und die entsprechenden Aminosäuren sind einander chemisch sehr ähnlich. Da die meisten dieser Abweichungen auch in den bekannten Peptiden der tierischen L-LDH-asen beobachtet werden (Abb. 8), bleiben diese Änderungen wohl ohne größeren Einfluß auf die enzymatische Katalyse.

Obwohl die angenommene Sequenz des Arg₆-Peptids der L-LDH-asen der 4 Laktobazillen noch durch eine Sequenzanalyse endgültig abgesichert werden müßte, sprechen schon die hier zur Verfügung stehenden Daten für eine so weitgehende Homologie, daß man annehmen muß, daß die tierischen L-LDH-asen und die allosterischen und nicht-allosterischen Enzyme der Bakterien auf ein gemeinsames LDH-Gen zurückgehen.

Der strikt konservative Charakter der Primärstruktur des substratbindenden Bereichs zeigt sich besonders in der einheitlichen Sequenz der entsprechenden Peptide verschiedener Vertebraten L-LDH-asen. Nur bei 2 der 6 Repräsentanten sehr verschiedener systematischer Gruppen tritt der Austausch eines Aminosäurerestes auf: Einer in Position 158, der andere in Position 167.

Dagegen weichen schon die Peptide der 4 Bakterien, die alle zur gleichen Gattung gehören, in 1 - 3 Aminosäureresten voneinander ab. Sogar die Repräsentanten innerhalb der Gruppe der allosterischen Enzyme wie die der nicht-allosterischen Enzyme unterscheiden sich im Austausch zweier Aminosäurereste voneinander. Dies läßt den Schluß zu, daß der phylogenetische Abstand zwischen den 4 Bakterien der gleichen Gattung größer ist, als der zwischen den 6 Vertebraten, die 4 verschiedenen Klassen angehören. Berücksichtigt man das höhere Alter und die wesentlich kürzere Generationszeit der Bakterien, so erscheint diese Feststellung nicht überraschend.

Der Austausch eines Threonin- durch einen Cysteinrest stellt wohl eine in der Evolution der LDH sehr wichtige Mutation dar; möglicherweise hat sie zu Beginn der Vertebraten-Evolution stattgefunden.

Ein ähnlich bedeutendes Ereignis stellt der Austausch von Serin durch Asparagin dar. Serin könnte typisch für die L-LDH-asen der Bakterien oder doch zumindest für die der Laktobazillen sein.

Diese Folgerungen sind zwar wegen der geringen Zahl an aufgeklärten Primärstrukturen noch sehr hypothetisch, sie können aber zu weiteren intensiven Untersuchungen auf diesem Gebiet anregen.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die immunologischen und chemischen Eigenschaften allosterisch regulierbarer und nicht regulierbarer L-LDH-asen verschiedener Milchsäurebakterien untersucht und miteinander verglichen.

Für die immunologischen Studien wurden gegen die gereinigten Enzyme von *L.casei* ssp. *casei* ATCC 393, von *L.curvatus* DSM 20010 und von *L.plantarum* ssp. *plantarum* ATCC 14917 Antikörper hergestellt.

I. Die immunologischen Studien ergaben:

1. Die monomeren und tetrameren Formen der L-LDH von *L.curvatus* und *L.casei* besitzen unterschiedliche Antigenität.
2. Die immunologischen Reaktionen der L-LDH-Mono- und Tetrameren von *L.curvatus* sprechen dafür, daß im Fall der *L.curvatus* L-LDH gegen Monomere, im Fall der *L.casei* und *L.plantarum* L-LDH gegen Tetramere Antikörper gebildet wurden.
3. Die Immundiffusion unter verschiedenen pH-Bedingungen bei An- bzw. Abwesenheit der Effektoren (Mn^{2+} und Fru-1,6-P₂) bestätigt die Grunderkenntnis über das Dissoziations-Assoziationsverhalten der L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curvatus*: Saure pH-Werte begünstigen den tetrameren Zustand, basische pH-Werte fördern die Dissoziation, wobei sich die Tetrameren der L-LDH von *L.casei* als pH-stabiler erweisen als die von *L.curvatus*.
4. Die Renaturierung der Monomeren beider L-LDH-asen verläuft unter den im Immundiffusionstest herrschenden Bedingungen (pH 5,5 mit Effektoren) vollständig; denn die Immunreaktion der reassozierten L-LDH-Formen sind von denen der im nativen Zustand eingesetzten Tetrameren

nicht zu unterscheiden. Allerdings gelingt diese Renaturierung nur, wenn L-LDH-Formen verwendet werden, die unter milden Bedingungen (15 h alkalische Spaltung) denaturiert wurden. Mit länger behandelten und damit stärker denaturierten L-LDH-Formen (60 h alkalische Spaltung) kann dagegen keine Renaturierung mehr festgestellt werden.

5. Um die antigenen Oberflächenstrukturen der tetrameren Formen der L-LDH von *L.curvatus* und *L.sake* mit denen der anderen, pH-stabileren L-LDH-asen vergleichen zu können, wurden für die L-LDH-asen von *L.curvatus* und *L.sake* durch die Zugabe von Mn^{2+} und Fru-1,6- P_2 zum Agarose-Gel Bedingungen geschaffen, die den tetrameren Zustand dieser L-LDH-asen im Immundiffusionstest gewährleisten.
6. Zwischen den allosterisch regulierbaren L-LDH-asen verschiedener Milchsäurebakterien konnte keine bevorzugte Ähnlichkeit gegenüber den nicht allosterischen Enzymen festgestellt werden.
7. Die L-LDH-asen der Streptobakterien verhalten sich mit Ausnahme der von *L.xylosus* relativ ähnlich.
8. Unter den L-LDH-asen der 3 Streptobakterien *L.casei*, *L.curvatus* und *L.plantarum* zeigt nur die von *L.plantarum* größere immunologische Ähnlichkeiten mit denen einiger Thermo- und Betabakterien.
9. Die enge Ähnlichkeitsbeziehung zwischen den L-LDH-asen von *L.casei* und Streptokokken bzw. Pediokokken stimmt mit der immunologischen Ähnlichkeit der Aldolasen dieser Organismen (London und Chace, 1976) überein. Beide Befunde sprechen für eine engere phylogenetische Beziehung von *L.casei* zu den Streptokokken und Pediokokken als zu den Thermo- und Betabakterien.
10. Das Ausbleiben jeglicher Immunpräzipitation mit den Extrakten von *B.adolescentis* und *B.pseudolongum* deutet auf

eine sehr geringe phylogentische Beziehung der Bifidobakterien zu den Streptobakterien hin.

II. Die chemische Analyse der allosterisch regulierbaren L-LDH-
asen von *L.casei* und *L.curvatus* und der nicht regulierbaren
L-LDH-asen von *L.plantarum* und *L.acidophilus* (DSM 20243)
führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Ein Vergleich der Gesamtaminosäurezusammensetzung der hier
untersuchten L-LDH-asen mit der anderer LDH-asen bakteri-
eller und tierischer Herkunft läßt 3 Gesetzmäßigkeiten
erkennen:
 - a) Die L-LDH-asen der bisher untersuchten Milchsäurebak-
terien besitzen mit nur 1 - 2 Cysteinresten pro Unter-
einheit einen im Vergleich zu anderen LDH-asen auffal-
lend geringen Cysteinanteil.
 - b) Bei allen bisher untersuchten bakteriellen LDH-asen
liegt der Anteil der Alaninreste mehr oder weniger deut-
lich über dem der Glycinreste; im Gegensatz dazu ist
bei allen tierischen LDH-asen der Anteil der Alaninreste
signifikant kleiner als der der Glycinreste.
 - c) Außerdem lassen sich Unterschiede zwischen den alloste-
risch regulierbaren L-LDH-asen von *L.casei* und *L.curva-
tus* einerseits und den nicht regulierbaren L-LDH-asen
von *L.plantarum* und *L.acidophilus* andererseits erkennen:
So sind die Anteile der Glycin- und Alaninreste bei den
2 nicht regulierbaren L-LDH-asen fast gleich, während
bei den allosterisch regulierbaren L-LDH-asen der der
Glycinreste deutlich geringer ist. Zudem zeichnen sich
die allosterisch regulierbaren L-LDH-asen von *L.casei*
und *L.curvatus* durch einen ausgesprochen hohen Anteil
an Isoleucinresten aus.
2. Die allosterisch regulierbaren Enzyme von *L.casei* und
L.curvatus unterscheiden sich durch den Besitz verschiede-
ner N- bzw. C-terminaler Aminosäuren (N-Terminus: Alanin;
C-Terminus: Phenylalanin) von den nicht regulierbaren

Enzymen von *L.plantarum* und *L.acidophilus* (N-Terminus: Prolin; C-Terminus: Serin).

3. Das unterschiedliche Peptidmuster der 4 L-LDH-asen nach Spaltung mit Trypsin bzw. Bromcyan und die deutlich verschiedenen isoelektrischen Punkte weisen auf eine gewisse Heterogenität der Aminosäuresequenz sowohl innerhalb der allosterisch regulierbaren als auch der nicht regulierbaren Enzyme hin.
4. Die Aminosäureanalyse eines allen 4 L-LDH-asen gemeinsamen 12er Peptids deckt eine weitgehende Homologie mit dem als "essentielles Cysteinpeptid" bekannten Sequenzbereich aus der substratbindenden Region der tierischen L-LDH-asen auf. Aufgrund dieser ausgeprägten Homologie muß man annehmen, daß die tierischen und die allosterisch regulierbaren bzw. nicht regulierbaren L-LDH-asen der Bakterien auf ein gemeinsames LDH-Gen zurückgehen.

Literaturverzeichnis

- Adams, M.J., Ford, G.C., Koekoek, R., Lentz, P.J., McPherson, A.,
Rossmann, M.G., Smiley, I.E., Schewitz, R.W., and A.J. Wonacott: Structure of lactate dehydrogenase at 2,8 Å resolution. *Nature* 227, 1098-1103 (1970).
- Adams, M.J., Buehner, M., Chandrasekhar, K., Ford, G.C., Hackert, M.L., Liljas, A., Rossmann, M.G., Smiley, I.E., Allison, W.S., Everese, J., Kaplan, N.O., and S.S. Taylor: Structure-function relationships in lactate dehydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 1968-1972 (1973).
- Allison, W.S., Admiraal, J., and N.O. Kaplan: The subunits of dogfish M₄ lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 244, 4743-4749 (1969).
- Armstrong, M.D.: The relationship between homoserine and its lactone. *J. Am. Chem. Soc.* 71, 3399-3402 (1949).
- Back, W.: Zur Artzugehörigkeit bierschädlicher Kokken.
Dissertation, Technische Universität München (1974).
- Banaszak, L.H. and R.A. Bradshaw: Malate dehydrogenase.
in: *The Enzymes* 11, Part A 3rd ed. (Boyer, P.D. ed.)
Academic Press New York, San Francisco, London (1975).
- Barry, S. and P. O'Carra: A simple general method for the preparation of "6-immobilized" analogues of AMP, ATP, NAD and of other adenine-containing compounds for affinity chromatography. *FEBS Lett.* 37, 134-139 (1973).
- Bethell, M.R., von Fellenberg, R., Jones, M.E., and L. Levine: Immunological studies of aspartate transcarbamylase.
I. Characterization of the native enzyme, catalytic and regulatory subunit-immune systems. *Biochemistry* 7, 4315-4322 (1968).

- Browman, J.E., Brubaker, R.R., Fischer, H., and P.E.Censon: Characterization of enterobacteria by starch-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase. *J.Bacteriol.* 94, 544-551 (1967).
- Brown, A.T., and C.L.Wittenberger: Fructose-1,6-diphosphate-dependent lactate dehydrogenase from a cariogenic streptococcus: Purification and regulatory properties. *J.Bacteriol.* 110, 604-615 (1972).
- Brown, A.T., Christian, C.P., and R.L.Eifert: Purification, characterization and regulation of a nicotinamide adenine dinucleotide-dependent lactate dehydrogenase from *Actinomyces viscosus*. *J.Bacteriol.* 122, 1126-1135 (1975).
- Campbell, J.W., Watson, H.C., and G.I.Hodgson: Structure of yeast phosphoglycerate mutase. *Nature* 250, 301-303 (1974).
- Cann, D.C. and M.E.Willox: Analysis of multimolecular enzymes as an aid to the identification of certain rapidly growing mycobacteria, using starch gel electrophoresis. *J.Appl. Bacteriol.* 28, 165-173 (1965).
- Cann, D.C., Hobbs, G., and J.M.Shewan: The identification of certain *Mycobacterium* species. in: *Identification Methods for Microbiologists* (Gibbs, B.M., and F.A.Skimer, eds.) Acad.Press Inc., London (1966).
- Cuatrecasas, P.: Protein purification by affinity chromatography. *J.Biol.Chem.* 245, 3059-3065 (1970).
- Dellaglio, F., Bottazzi, V., and M.Vescovo: Desoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 25, 160-172 (1975).

- Duggan, E.L.: Measurement of amino acids by column chromatography. in: *Methods in Enzymology* 3, 492-504 (Colowick, S.P., and N.O.Kaplan eds.) Academic Press New York (1957).
- Dynon, M.K., Jago, G.R., and B.E.Davidson: The subunit structure of lactate dehydrogenase from *Streptococcus cremoris* US₃. *Eur.J.Biochem.* 30, 348-353 (1972).
- Easeley, C.W.: Combination of specific color reactions useful in the peptide mapping technique. *Biochim.Biophys.Acta* 107, 386-388 (1965).
- Eventhoff, W., Hackert, M.L., and M.G. Rossmann: A low-resolution cristallographic study of porcine heart lactate dehydrogenase. *J.Mol.Biol.* 98, 249-258 (1975).
- Fondy, T.F., Everse, J., Driscoll, G.A., Castillo, F., Stolzenbach, F., and N.O.Kaplan: The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. IV. Function of sulfhydryl groups in lactic dehydrogenases and the sequence around the essential group. *J.Biol.Chem.* 240, 4219-4234 (1965).
- Fraenkel-Conrat, H., Harris, J.I., and A.L.Levy: Recent development in techniques for terminal and sequence studies in peptides and proteins. *Meth.Biochem.Anal.* 2, 359-470 (1955).
- Fujiki, H., and G.Zurek: The subunits of DNA-dependent RNA polymerase from *E.coli*. I. Amino acid analysis and primary structure of the N-terminal regions. *FEBS Lett.* 55, 242-244 (1975).
- Garvie, E.: Lactic dehydrogenases of strains of the genus *Leuconostoc*. *J.Gen.Microbiol.* 58, 85-94 (1969).
- Gasser, F.: Elektrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*. *J.Gen.Microbiol.* 62, 223-239 (1970).

- Gasser, F., Doudoroff, M., and R.Contopoulos: Purification and properties of NAD-dependent lactic dehydrogenases of different species of *Lactobacillus*. *J.Gen.Microbiol.* 62, 241-250 (1970).
- Gasser, F. and G.Gasser: Immunological relationships among lactic dehydrogenases in the genera *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. *J.Bacteriol.* 106, 113-125 (1971).
- Götz, F., and K.H.Schleifer: Purification and properties of a fructose-1,6-diphosphate activated L-lactate dehydrogenase from *Staphylococcus epidermidis*. *Arch.Microbiol.* 105, 303-312 (1975).
- Goldberg, E.: Amino acid composition and properties of crystalline lactate dehydrogenase X from mouse testes. *J.Biol.Chem.* 247, 2044-2048 (1972).
- Gonenne, A., and J.Lebowitz: Estimation of molecular weights of small proteins on polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt.Biochem.* 64, 414-424 (1975).
- Gordon, G.L., and H.W.Doelle: Purification, properties and immunological relationship of L(+)-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. *Eur.J.Biochem.* 67, 543-555 (1976).
- Gross, E., and B.Witkop: Selective cleavage of the methionyl peptide bonds in ribonuclease with cyanogen bromide. *J.Am.Chem.Soc.* 83, 1510-1511 (1961).
- Gurd, F.R.N.: Carboxymethylation. in: *Methods in Enzymology* 25, 424-438 (Hirs, C.H.W., and S.N.Timasheff eds.) Academic Press New York and London (1972).
- Harris, I.: Structure and catalytic activity of alcohol dehydrogenases. *Nature* 203, 30-34 (1964).

Hartley, B.S.: Strategy and tactics in protein chemistry.
Biochem. J. 119, 805-822 (1970).

Heil, A., and W.Zillig: Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. FEBS Lett. 11, 165-168 (1969).

Helming, Ch.: Biochemisch-taxonomische Untersuchungen zur Untergliederung der Art *L.acidophilus*.
Dissertation, Universität München (1976).

Hirs, C.H.W.: The oxidation of ribonuclease with performic acid.
J.Biol.Chem. 219, 611-621 (1956).

Holbrook, J.J., Pfleiderer, G., Mella, K., Volz, M., Leskowac, W., and R.Jeckel: The importance of SH-groups of enzymic activity. 7. The amino acid sequence around the essential SH-group of pig heart lactate dehydrogenase, isoenzyme I. Eur.J.Biochem. 1, 476-481 (1967).

Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J., and M.G.Rossmann: Lactate dehydrogenase. in: The Enzymes 11, Part A 3rd ed. (Boyer, P.D. ed.) Academic Press New York, San Francisco, London (1975).

Holland, R., Pritchard, G.G.: Regulation of the L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* by fructose-1,6-diphosphate and metal ions. J.Bacteriol. 121, 777-784 (1975).

Hulett-Cowling, F.M., and L.L.Campbell: Purification and properties of an alkaline phosphatase of *Bacillus licheniformis*. Biochemistry 10, 1364-1371 (1971).

Hulett-Cowling, F.M., and L.L.Campbell: Molecular weight and subunits of the alkaline phosphatase of *Bacillus licheniformis*. Biochemistry 10, 1371-1376 (1971).

- Jago, G.R., Nickel, L.W., O'Dea, K., and W.H.Sawyer: Physicochemical studies on the lactate dehydrogenase of *Streptococcus cremoris* UG₃: The effect of modifiers. *Biochim.Biophys.Acta* 250, 271-285 (1971).
- Jonas, H.A., Anders, R.F., and G.R.Jago: Factors affecting the activity of lactate dehydrogenase of *Streptococcus cremoris*. *J.Bacteriol.* 111, 397-403 (1972).
- Jovin, T., Chrambach, A., and M.A.Naughton: An apparatus for preparative temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt.Biochem.* 2, 351-369 (1964).
- Kandler, O., und K.C.Stetter: Der Beitrag neuerer biochemischer Merkmale für die Systematik der Laktobazillen. *3.Symp.Techn.Mikrobiol.*, Berlin (1973).
- Karlsson, C., Davies, H., Öhmann, J., and U.Andersson: Analytical thin layer gel electrophocusing in polyacrylamide gel. LKB Application Note, LKB-Produkte AB S-16125 Bromma 1, Sweden (1973).
- Kiltz, H.H., Keil, W., Griesbach, M., Petry, K., and H.Meyer: The primary structure of porcine lactate dehydrogenase: Isoenzymes M₄ and H₄. Hoppe-Seyler's *Z.Physiol.Chem.* 358, 123-127 (1977).
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- Lauer, E.: Physiologische und biochemische Untersuchungen zur Taxonomie der Gattung *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924. Dissertation, Universität München (1974).
- Lauer, E., and O.Kandler: Mechanism of the variation of the acetate/lactate ratio during glucose fermentation by *Bifidobacterium*. *Arch.Microbiol.* 110, 271-277 (1976).

- Lazdunski, C.J., Pages, J.M., and D.Louvard: Antibodies as probes for detection of conformational changes of proteins. A model study with the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 97, 309-335 (1975).
- De Ley, J. and K.Kerstens: Biochemical evolution in bacteria. in: *Comprehensive Biochemistry* 29, 1-77 (Florkin, M., and E.H.Storz eds.) Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam, London, New York (1975).
- Li, T.K., and B.L.Vallee: Active-center peptides of liver alcohol dehydrogenase. I. The sequence surrounding the active cysteinyl residues. *Biochemistry* 3, 869-873 (1964).
- London, J., Meyer, E.Y., and S.R.Kulczyk: Comparative biochemical and immunological study of malic enzyme from two species of lactic acid bacteria: Evolutionary implications. *J.Bacteriol.* 106, 126-137 (1971 a).
- London, J., Meyer, E.Y., and S.R.Kulczyk: Detection of relationships between *Streptococcus faecalis* and *Lactobacillus casei* by immunological studies with two forms of malic enzyme. *J.Bacteriol.* 108, 196-201 (1971 b).
- London, J., and K.Kline: Aldolase of lactic acid bacteria: a case history in the use of an enzyme as an evolutionary marker. *Bacteriol.Rev.* 37, 453-478 (1973).
- London, J.: Variations in the quaternary structure of three lactic acid bacteria aldolases. Evidence for the existence of a class I and class II aldolases in *Lactobacillus casei*. *J.Biol.Chem.* 249, 7977-7983 (1974).
- London, J., and N.M.Chace: Aldolases of the lactic acid bacteria. Demonstration of immunological relationship among eight genera of gram positive bacteria using an anti-pediococcal aldolase serum. *Arch.Microbiol.* 110, 121-128 (1976).

- De Man, J.C., Rogosa, M., and M.E.Sharpe: A medium for the cultivation of lactobacilli. *J.Appl.Bacteriol.* 23, 130-135 (1960).
- Matsubara, H., and R.M.Sasaki: High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 35, 175-181 (1969).
- Mayr, U.: Untersuchung der kinetischen Eigenschaften und der Quartärstruktur von allosterischen Lactatdehydrogenasen bei Lactobacillen.
Dissertation, Universität München (1977).
- Mella, K., Torff, H.J., Fölschle, Th.J., and G.Pfleiderer: Die carboxyl-terminale Aminosäuresequenz der Lactat-Dehydrogenase aus Schweine Herz. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 350, 28-34 (1969).
- Mirault, M.E., and K.Scherrer: Isolation of preribosomes from HeLa cells and their characterization by electrophoresis on uniform and exponential-gradient-polyacrylamide gels. *Eur.J.Biochem.* 23, 372-386 (1971).
- Mosbach, K., Guilford, H., Ohlsson, R., and M.Scott: General ligands of affinity chromatography. *Biochem.J.* 127, 625-631 (1977).
- Mou, L., Mulvena, D.P., Jonas, H.A., and G.R.Jago: Purification and properties of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent D- and L-lactate dehydrogenases in a group N Streptococcus. *J.Bacteriol.* 111, 392-396 (1972).
- Neimark, H., and R.M.Lemcke: Occurrence and properties of lactic dehydrogenases of fermentative Mycoplasmas. *J.Bacteriol.* 111, 633-640 (1972).

- Neimark, H., and M.C.Tung: Properties of a fructose-1,6-diphosphate activated lactate dehydrogenase from *Acholeplasma laidlawii* type A. *J.Bacteriol.* 114, 1025-1033 (1973).
- Norris, J.R., and H.D.Burges: Esterases of crystalliferous bacteria pathogenic for insects: epizootobiological applications. *J.Insect.Pathol.* 5, 460-472 (1963).
- Norris, J.R.: The classification of *Bacillus thuringensis*. *J.Appl.Bacteriol.* 27, 439-447 (1964).
- O'Carra, P., and S.Barry: Affinity chromatography of lactate dehydrogenase. *FEBS Lett.* 21, 281-285 (1972).
- Orla-Jensen, J.: The lactic acid bacteria. D. Kgl. Danske Videnskabernes Selskrabs Skifter, Naturv. Og. Mathematisk Afd., 8. Raekke, V.2 79-197 (1919).
- Orla-Jensen, S.: La classification des bacteries lactiques. *Lait* 4, 468-474 (1924).
- Ouchterlony, O.: Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol.Scand.* 26, 507-517 (1949).
- Perham, R.N., and J.I.Harris: Amino acid sequences around the reactive cysteine residues in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *J.Mol.Biol.* 7, 316-320 (1963).
- Pesce, A., Fondy, Th.P., Stolzenbach, F., Castillo, F., and N.O.Kaplan: The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. III. Properties of the H_4 and M_4 enzymes from a number of vertebrates. *J.Biol.Chem.* 242, 2151-2167 (1967).
- Pfleiderer, G., Woenckhaus, C., Jeckel, D., and K.Mella: in: "Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases" (H.Sund, ed.) Springer-Verlag, Berlin, New York (1970).

- Prager, E.M., and A.C.Wilson: The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. II. Comparison of precipitin and micro-complement fixation results. *J.Biol.Chem.* 246, 7010-7017 (1971).
- Rao, S.T., and M.G.Rossmann: Comparison of super-secondary structures in proteins. *J.Mol.Biol.* 76, 241-256 (1973).
- Rauen, H.M.: *Biochemisches Taschenbuch*, 2. Teil, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1964).
- Robinson, K.: An examination of *Corynebacterium* by gel electrophoresis. *J.Appl.Bacteriol.* 29, 179-184 (1966).
- Rose, Z.B., Hamasaki, N., and S.Dube: The sequence of a peptide containing the active site phosphohistidine of phosphoglycerate mutase from chicken breast muscle. *J.Biol.Chem.* 250, 7939-7942 (1975).
- Rossmann, M.G., Liljas, A., Bränden, C.I., and L.J.Banaszak: Evolutionary and structural relationship among dehydrogenases. in: *The Enzymes* 11, Part A 3rd edn. (Boyer, P.D., ed.) Academic Press New York, San Francisco, London (1975).
- Schleifer, K.H., Kocur, M.: Classification of *Staphylococci* based on chemical and biochemical properties. *Arch.Microbiol.* 93, 65-85 (1973).
- Schlesinger, M.J., and K.Barrett: The reversible dissociation of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. I. Formation and reactivation of subunits. *J.Biol.Chem.* 240, 4284-4292 (1965).
- Schlesinger, M.J.: The reversible dissociation of the alkaline-phosphatase of *Escherichia coli*. II. Properties of the subunit. *J.Biol.Chem.* 240, 4292-4298 (1965).

- Schwick, H.G., Störiko, K., and W.Becker: Quantitative Plasmo-protein-Bestimmung durch Immunpräzipitation. Laboratoriumsblätter für die med. Diagnostik Nr. 3, Behringwerke AG 6230 Frankfurt (1971).
- Sharpe, M.E., Garvie, E.I., and R.H.Tilbury: Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. J.Appl.Microbiol. 23, 389-397 (1972).
- Smith, I.: Chromatographic and Electrophoretic Techniques, 1, London: William Heinemann Medical Books Ltd. and New York: Interscience Publishers (1960).
- Spielman, H., Erickson, R.P., and C.J.Epstein: The separation of lactate dehydrogenase X from other lactate dehydrogenase isoenzymes of mouse testes by affinity chromatography. FEBS L.ett. 35, 19-23 (1973).
- Stegink, L.D., Sanborn, B.M., Brummel, M.C., and C.S.Vestling: Beef heart H₄ lactate dehydrogenase: N-terminal and C-terminal residuel. Biochim.Biophys.Acta 251, 31-37 (1971).
- Stetter, K.O.: Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäureisomerengemischen bei *Lactobacillen*. Dissertation, Technische Universität München (1973).
- Stetter, K.O. and W.Zillig: Transcription in *Lactobacillaceae*: DNA-dependent RNA polymerase from *Lactobacillus curvatus*. Eur.J.Biochem. 48, 527-540 (1974).
- Tarmy, E.M. and N.O.Kaplan: Chemical characterization of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli* B. J.Biol.Chem. 243, 2579-2586 (1968).
- Taylor, S.S., Allison, W.S., and N.O.Kaplan: The amino acid sequence of the tryptic peptides isolated from dogfish M₄ lactate dehydrogenase. J.Biol.Chem. 250, 8740-8747 (1975).

- Taylor, S.S., and S.Oxley: Homologies in the active site regions of lactate dehydrogenase. Arch.Biochem.Biophys. 175, 373-383 (1976).
- Taylor, S.S.: Amino acid sequence of dogfish muscle lactate dehydrogenase. J.Biol.Chem. 252, 1799-1806 (1977).
- Tschesche, H., and S.Kupfer: C-terminal-sequence determination by carboxydase C from orange leaves. Eur.J.Biochem. 26, 33-36 (1972).
- Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., and M.Weigele: Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range. Sci. 178, 871-872 (1972).
- De Vries, W., Gerbrandy, S.J., and A.H.Stouthamer: Carbohydrate metabolism in Bifidobacterium bifidum. Biochim.Biophys.Acta. 136, 415-425 (1967).
- De Vries, W., Kapteijn, W.M.C., Van der Beek, E.G., and A.H.Stouthamer: Molar growth yields and fermentation balances of Lactobacillus casei L3 in batch cultures and in continuous cultures. J.Gen.Microbiol. 63, 333-345 (1970).
- Wachsmuth, E.D., Pfeleiderer, E., and T.Wieland: Aminosäurezusammensetzung von Isoenzymen der Lactatdehydrogenase aus menschlichen und tierischen Organen. Biochem.Z. 340, 80-94 (1964).
- Weber, K., and M.Osborn: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244, 4406-4412 (1969).
- Wheat, T., Goldberg, E., and E.Margoliash: Primary structure of the essential thiol peptide from the LDH C subunit. Biochem. Biophys.Res.Comm. 74, 1066-1070 (1977).

- Wilson, A.C., Kaplan, N.O., Levine, L., Pesce, A., Reichlin, M., and W.S.Allison: Evolution of lactic dehydrogenases. Fed.Proc. 23, 1258-1266 (1964).
- Wittenberger, C.L., and N.Angelo: Purification and properties of a fructose-1,6-diphosphate-activated lactate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*. J.Bacteriol. 101, 717-724 (1970).
- Wolin, M.J.: Fructose-1,6-diphosphate requirement of streptococcal lactic dehydrogenase. Sci. 146, 775-777 (1964).
- Yamada, S., and H.A.Itano: Phenanthrenquinone as an analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines. Biochim.Biophys.Acta 130, 538-540 (1965).
- Yoshida, A., and E.Freese: Purification and chemical characterization of lactate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. Biochim.Biophys.Acta 99, 56-65 (1965).
- Young, E.G.: Occurence, classification, preparation and analysis of proteins. in: Comprehensive Biochemistry 7, 1-53 (Florkin, M., and E.H.Storz eds.) Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam, Lonon, New York (1963).
- Zuzuki, J., and K.Kitahara: Base composition of deoxyribonucleic acid in *Sporolactobacillus inulinus* and other lactic bacteria. J.Gen.Appl.Microbiol. 10, 305-311 (1972).

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Prof. Dr. O. Kandler von 1974 - 1977 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für sein reges Interesse an meiner Arbeit, für alle Anregungen und wertvollen Diskussionen.

Ein Teil dieser Arbeit (chemische Analysen, Herstellen der Antiseren) wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt hier Herrn Dr. H. Fujiki für seine persönliche Anteilnahme, tatkräftige Unterstützung und vielfältigen Anregungen.

Auch danke ich Frl. G. Zurek und Frl. R. Soo für ihre freundliche Hilfe.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. K. O. Stetter für viele anregende Diskussionen und praktische Hinweise danken.

Bei Herrn Prof. F. Wagner und Herrn Dipl. Ing. Wania (Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Stöckheim) bedanke ich mich für die Massenzucht von *L.casei* und *L.curvatus*.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Reinhard Hensel
Geburtsdatum	2. Okt. 1949
Geburtsort	Nördlingen
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1956 - 1960	Volksschule Nördlingen
1960 - 1969	Theodor-Heuss-Gymnasium (humanistischer Zweig), Nördlingen
Mai 1969	Abitur

Studium

1969 - 1974	Studium der Biologie und Chemie für das höhere Lehramt an der Universität München
Frühjahr 1974	wiss. Prüfung für das Lehramt an Gymnasien

Promotion

1974 - 1977	Promotion am Lehrstuhl für Botanik der Universi- tät München unter Leitung von Prof. Dr. O. Kandler
1974 - 1976	wiss. Hilfskraft
seit Sept. 1976	Verwalter einer wiss. Assistentenstelle

